

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)
Centre Eau Terre Environnement (ETE)

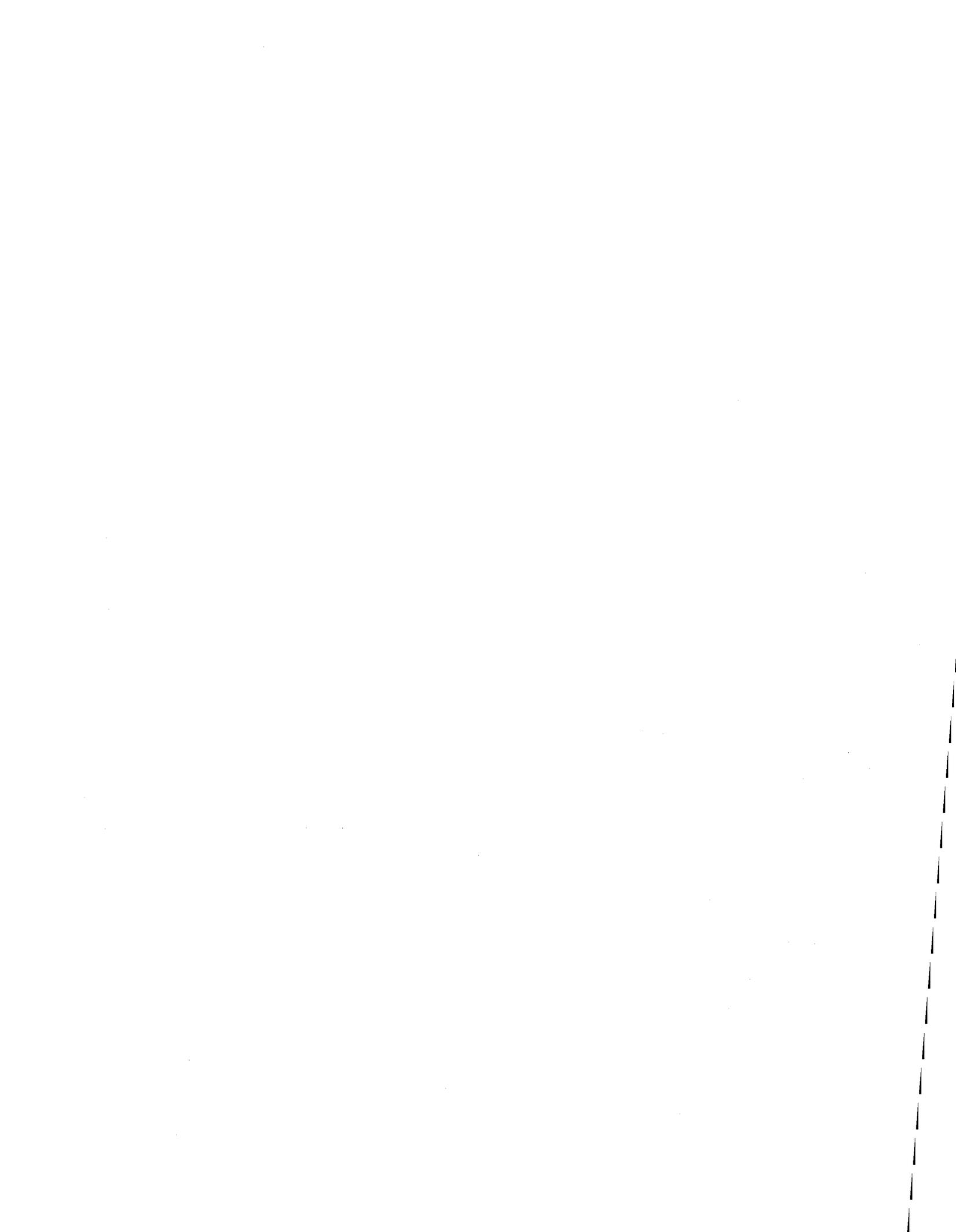
**PRÉTRAITEMENT DES BOUES D'ÉPURATION POUR
ACCROÎTRE LA BIODÉGRADABILITÉ ET ÉLIMINER
SIMULTANÉMENT LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**

Par
Thi Thanh Ha Pham

Thèse présentée
Pour l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph.D.) en Sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Examineurs externes	James-Tonyi Agbebavi, Ph.D (Université du Québec à Trois-Rivières)
	Ronald Droste, Ph.D (Université d'Ottawa)
Examineur interne	Jean-Christian Auclair, Ph.D (INRS-ETE)
Directeur de recherche	Rajeshwar D. Tyagi, Ph.D. (INRS-ETE)



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur *Rajeshwar D. Tyagi* pour m'avoir donné l'opportunité d'apporter ma contribution dans un projet visant le prétraitement des boues d'épuration pour la production des produits à valeur ajoutée. Je le remercie pour ses suggestions, conseils, et exigences ainsi que sa patience et sa disponibilité. Je remercie spécialement Dr. *Satinder K. Brar* pour ses aides précieuses et ses suggestions durant cette thèse.

Je remercie les examinateurs Dr. *Jean-Christian Auclair*, Dr *James-Tonyi Agbebavi*, Dr. *Ronald Droste*, pour avoir accepté faire partie du jury d'évaluation. Je remercie Dr *Simon Barnabé* pour ses conseils utiles au début de mes études doctorales ainsi que sa correction du français de la thèse.

Je remercie Dr. *Sinh Le Quoc* pour m'avoir donné l'opportunité d'étudier à INRS-ETE.

Je remercie les membres de mon équipe de recherche, soit *Mathieu, Jean-Philippe, Kokou, Khanh, Bala, Mausam, Jyothi, Josée-Anne, Jean-Robert, Sye Hana, François*, ainsi que le personnel de l'INRS-ETE, soit *Suzanne Dussault, Johanne Desrosiers, Pauline Fournier, Michèle Bordeleau, René Rodrigue, Stéphane Prémont, Lise Rancourt* et *Sébastien Duval* pour leur support moral et technique.

Finalement, je remercie mes amis, ma famille et ma belle-famille pour leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail. Je remercie particulièrement mon mari, *Tung*, pour sa patience et toute l'attention qu'il me porte. Ma fille *Chi* et mon garçon *Khoi* m'ont apporté toute la force morale.

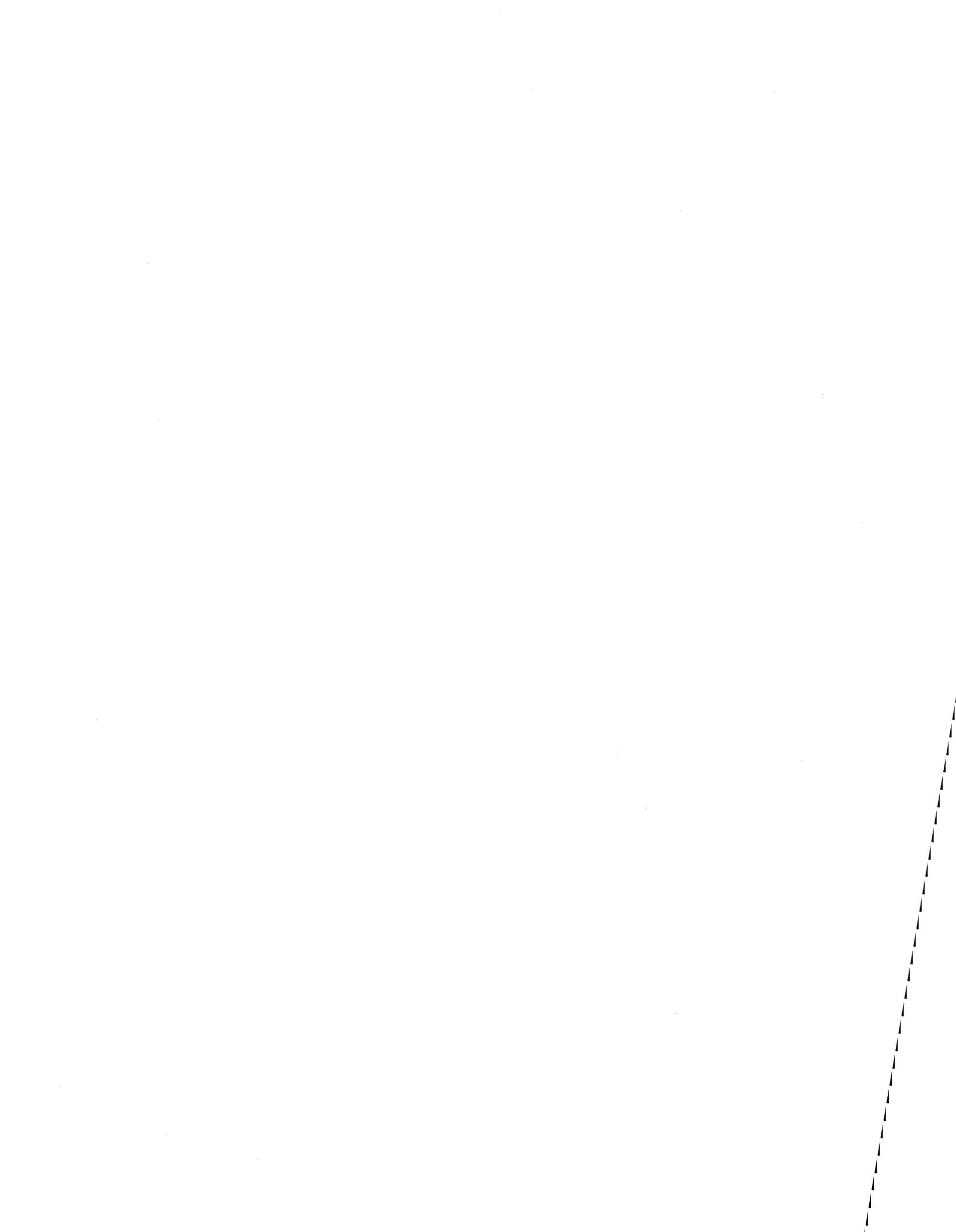


TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABBREVIATIONS	xiii
Résumé.....	xv
Abstract	xix
CHAPITRE 1 SYNTHÈSE.....	1
1.1. Introduction	1
1.2. Problématique.....	3
1.2.1. <i>Biodégradabilité des boues d'épuration</i>	3
1.2.1.1. Faible biodisponibilité des boues.....	3
1.2.1.2. Hydrolyse dans digestion anaérobie	3
1.2.1.3. Transfert de masse lors de la digestion aérobie.....	4
1.2.2. <i>La présence potentielle de perturbateurs endocriniens dans les produits à valeur ajoutée issus de boues d'épuration</i>	5
1.2.2.1. Caractéristiques des composés organiques des boues.....	5
1.2.2.2. La présence des phtalate dans les boues.....	5
1.2.2.3. Bis (2-éthylhexyl) phtalate, polluant prioritaire	6
1.3. Revue de littérature.....	7
1.3.1. <i>La composition typique des boues d'épuration</i>	7
1.3.2. <i>Effet du prétraitement des boues d'épuration sur la production de produits à valeur ajoutée</i>	9
1.3.2.1. Solubilisation des matières organiques.....	9
1.3.2.2. Augmentation de la biodégradabilité des boues	10
1.3.2.3. Modification des caractères physiques des boues.....	10
1.3.3. <i>Méthodes de prétraitement</i>	12
1.3.3.1. Les processus physiques.....	12
1.3.3.1.1. Ultrasonification	12
1.3.3.1.1.1. <i>Le mécanisme de l'ultrasonification</i>	12
1.3.3.1.1.2 <i>Les paramètres de l'ultrasonification affectant la désintégration des boues</i>	13
1.3.3.1.1.3 <i>Effet de l'ultrasonification sur le traitement des boues</i>	14
1.3.3.1.2. Hydrolyse thermique	15

1.3.3.1.2.1. Paramètres de l'hydrolyse thermique	15
1.3.3.1.2.2. Effet de l'hydrolyse thermique sur la biodégradabilité des boues.....	15
1.3.3.2. Les processus chimiques	16
1.3.3.2.1. Ozonation	16
1.3.3.2.2. Oxydation Fenton	18
1.3.3.2.2.1. Mécanisme	18
1.3.3.2.2.2. Paramètres de l'oxydation Fenton.....	19
1.3.3.2.2.3. L'effet de l'oxydation Fenton sur le traitement des boues	20
1.3.3.2.3. Hydrolyse alcaline et thermo - alcaline	21
1.3.3.3. Prétraitement biologique	23
1.3.4. Le comportement de phthalate de bis (2-éthylhexyle) et de ses métabolites toxiques dans des boues d'épuration.....	25
1.3.4.1. Caractéristiques générales du phthalate de bis (2-éthylhexyle)	25
1.3.4.2. Voie de dégradation de DEHP entraînant la formation de métabolites toxiques	25
1.3.4.3. Prétraitement pour l'amélioration de la biodégradabilité des boues et l'élimination simultanée des phthalates.....	28
1.3.4.4. Biodégradation du DEHP durant le traitement des boues d'épuration	29
1.3.4.4.1. L'enlèvement du DEHP lors du traitement des eaux usées.....	29
1.3.4.4.2. L'enlèvement du DEHP lors du compostage des boues.....	30
1.3.4.4.3. L'enlèvement du DEHP par la digestion des boues	30
1.3.4.4.4. L'enlèvement du DEHP par des microorganismes	31
1.4. Hypothèses – Objectifs – Originalité	33
1.4.1. Hypothèses de recherche	33
1.4.2. Objectifs de recherche	34
1.4.3. Originalité de la recherche.....	35
1.5. Démarche méthodologie.....	37
1.5.1. Plan expérimental.....	37
1.5.2. Démarche méthodologie.....	38
1.6. Résultats	39
1.6.1. L'optimisation de l'ultrasonification des boues d'épuration	39
1.6.2. L'optimisation de l'oxydation Fenton des boues d'épuration	39
1.6.3. Effet de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton sur la fermentation des boues d'épuration par Bacillus thuringensis	40

1.6.4.	<i>Effet de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton sur les propriétés rhéologiques des boues d'épuration</i>	40
1.6.5	<i>Effet de l'ultrasonification et l'oxydation Fenton sur la biodégradation du DEHP</i>	41
	RÉFÉRENCES	43
	CHAPITRE 2 EFFET DE PRÉTRAITEMENT SUR LA PRODUCTION DES PRODUITS À VALEUR AJOUTÉE	53
2.1.	Ultrasonification of wastewater sludge – Consequences on biodegradability and flowability	53
2.2.	Optimization of Fenton oxidation pre-treatment for <i>B. thuringiensis</i> – based production of value added products from wastewater sludge	97
	CHAPITRE 3 EFFET DE PRÉTRAITEMENT SUR LES CARACTÈRES RHÉOLOGIQUES DES BOUES D'ÉPURATION	139
3.1.	Influence of ultrasonification and Fenton oxidation pre-treatment on rheological characteristics of wastewater sludge	139
	CHAPITRE 4 EFFET DE PRÉTRAITEMENT SUR LA BIODÉGRADATION DU PHTALATE DE DI-(ÉTHYLHEXYLE)	183
4.1.	Effect of ultrasonification and Fenton oxidation on biodegradation of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in wastewater sludge	183
	CHAPITRE 5 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	223
5.1.	Conclusions	223
5.1.1.	<i>Augmentation de la biodégradabilité des boues</i>	223
5.1.2.	<i>L'enlèvement du DEHP</i>	223
5.1.3.	<i>Modification des caractères rhéologiques des boues</i>	224
5.2.	Recommandations	224
5.2.1.	<i>Prétraitement</i>	224
5.2.2.	<i>Obtention de produits à valeur ajoutée</i>	224
5.2.3.	<i>Biodégradation du DEHP dans les boues</i>	225
	ANNEXES	227
ANNEXE I	OPTIMIZATION OF FENTON OXIDATION PRE-TREATMENT FOR <i>B. THURINGIENSIS</i> – BASED PRODUCTION OF VALUE ADDED PRODUCTS FROM WASTEWATER SLUDGE	229
ANNEXE II	INFLUENCE OF ULTRASONIFICATION AND FENTON OXIDATION PRE-TREATMENT ON RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF WASTEWATER SLUDGE	233

ANNEXE III	EFFECT OF ULTRASONIFICATION AND FENTON OXIDATION ON BIODEGRADATION OF BIS(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE (DEHP) IN WASTEWATER SLUDGE	259
ANNEXE IV	DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DU TEST DE BIODÉGRADABILITÉ.....	263
ANNEXE V	DONNÉES DES TRAVAUX D'OPTIMISATION	265
ANNEXE VI	ÉQUATIONS SUPPLÉMENTAIRES.....	267

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1	Littérature sur les résultats des processus de prétraitement ultrasonique	14
Tableau 2	Littérature sur les résultats des processus de prétraitement thermique	16
Tableau 3	Littérature sur les résultats des processus de l’ozonation.....	17
Tableau 4	Littérature récente sur les résultats des processus de l’oxydation Fenton	21
Tableau 5	Travaux sur les traitements alcalin et thermo-alcalin des boues.	23

CHAPITRE 2

Table 1	Codes and values of independent variables of experimental designs for screening using response surface methodology	87
Table 2	Changes in analytical parameters after ultrasonification (at optimal conditions: Ultrasonification intensity: 0.75 W/cm ² ; Time: 60 min; TS=23 g/L)	88
Table 3	Results of screening experiments of the 2 ³⁻¹ FFD	89
Table 4	Results of SCOD increment and biodegradability of optimization experiments of CCD	90
Table 5	Effect of estimation and regression coefficient of the components of the model fitted to the data of CCD.....	91
Table 6	Codes and values of independent variables of different levels of 2 ⁵⁻¹ FFD and 2 ³ CCD	129
Table 7.	Solubilization and biodegradability of FFD- screening experiments.....	130
Table 8.	Solubilization and biodegradability of CCD- experiments	131
Table 9	Analysis of variance	132

CHAPITRE 3

Table 1	Rheological models of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges	173
Table 2	Cut-off diameter d ₅₀ of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges at TS concentration 10 – 40 g/L	174

CHAPITRE 4

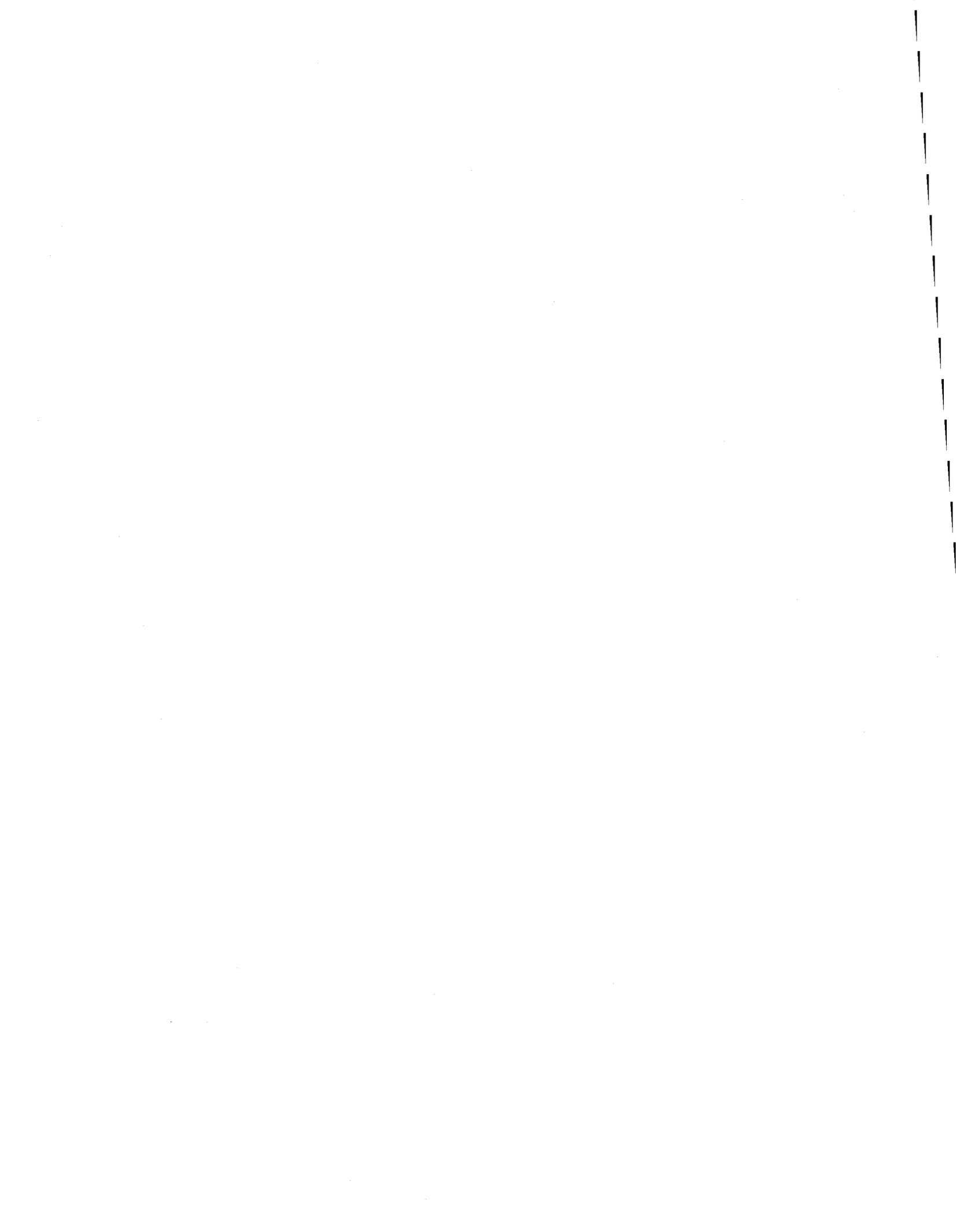
Table 1	Selected ions for the SIM mode detection.....	217
Table 2	Limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), ratio conformity and recovery of the compounds from sewage sludge.....	218

Table 3	Concentration of DEHP and its degradation products in different sludges along with characteristics of the sludges	219
Table 4	Fate of DEHP and its metabolites during Bt-fermentation.....	220

CHAPITRE 5

Table 1	Variation of (a) viable cell and; (b) spore count during <i>Bacillus thuringiensis</i> growth in raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS), and Fenton oxidized sludge (FS).....	231
Table 1a	Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 10 g/L.....	235
Table 1b	Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 20 g/L.....	236
Table 1c	Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 25 g/L.....	237
Table 1d	Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 30 g/L.....	238
Table 1e	Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 40 g/L.....	239
Table 2	Thixotropic behaviour of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 25 g/L.....	240
Table 3	Evolution of viscosity as function of solids concentration and pre-treatment processes.....	241
Table 4	Evolution of Power model parameters (consistency and flow index) as a function of solids concentration and pre-treatment processes of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS), and Fenton oxidized sludge (FS).....	241
Table 5a	Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 10 g/L	242
Table 5b	Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 20 g/L	245
Table 5c	Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 25 g/L	248
Table 5d	Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 30 g/L	251

Table 5e	Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 40 g/L	254
Table 6	CST measurement of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton sludge (FS) at TS 10–40 g/L.....	257
Table 7	Effect of pre-treatment on solubilization and biodegradability of sludge.....	257
Table 8	Removal of DEHP and 2-ethylhexanoic acid calculated as mass during aerobic digestion (20 days of incubation time) in raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS), and Fenton oxidized sludge (FS).....	261



LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1	Structure proposée de floc des boues (Neyens et Bayens, 2003a).....	8
Figure 2	Voie proposée de la biodegradation du phtalate de di(2-éthylhexyle) (Staples, 1997; Horn <i>et al.</i> (2004); Amir <i>et al.</i> (2005)).....	27
Figure 3	Scématic récapitulatif du plan expérimental.....	37

CHAPITRE 2

Figure 1	Schematic of optimization of ultrasonification process.....	92
Figure 2	Response surface plots of biodegradability as a function of: (a) ultrasonification intensity and time (TS constant) and (b) ultrasonification intensity and solids concentration (time constant). Legends represent the biodegradability measured as percentage.	93
Figure 3	Response surface plot of solubilization as a function of ultrasonification intensity and time. Legends represent the SCOD increment measured as percentage.....	95
Figure 4	Viscosity evolution of raw and ultrasonicated sludge as a function of TS concentration, shear rate and time.....	96
Figure 5	Response surface plots for solubilization as a function of: (a) Total solids and $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; (b) Time and $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; and (c) Time and total solids.	133
Figure 6	Response surface plots for biodegradability as a function of: (a) Total solids and $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; (b) Time and $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; and (c) Time and total solids.	135
Figure 7	Variation of (a) viable cell and; (b) spore count during <i>Bacillus thuringiensis</i> growth in raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges.....	137

CHAPITRE 3

Figure 1	Viscosity and shear stress vs shear rate profiles of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges at TS concentrations of a) 10 g/L; b) 20 g/L; c) 25g/L; d) 30 g/L; and e) 40 g/L	175
Figure 2	Thixotropic behaviour of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges (TS = 25 g/L)	176
Figure 3	Evolution of viscosity as function of solids concentration and pre-treatment processes	177
Figure 4	Evolution of Power model parameters as function of solids concentration and pre-treatment processes	178

Figure 5	Volume particle size distribution of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges at TS concentrations of a) 10 g/L; b) 20 g/L; c) 25 g/L; d) 30 g/L; e) 40 g/L.....	179
Figure 6	CST measurement of raw, ultrasonicated and Fenton sludges at TS 10 – 40 g/L	180
Figure 7	Effect of pre-treatment on solubilization and biodegradability of sludge	181

CHAPITRE 4

Figure 1	Removal of DEHP and 2-ethylhexanoic acid calculated as mass during aerobic digestion (20 days of incubation time)	221
Figure 2	Removal of DEHP and 2-ethylhexanoic acid calculated as mass during aerobic digestion (20 days of incubation time)	222

LISTE DES ABBREVIATIONS

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	carbone
CPE	composé de perturbateur endocrinien
DBO	demande biologique en oxygène
DCO	demande chimique en oxygène
DCOS	demande chimique en oxygène soluble
DCOT	demande chimique en oxygène total
DEHP	phtalate de di-(2-éthylhexyle)
EAP	Ester de l'acide phtalique
FS	Fenton oxidized sludge (boue traitée par l'oxydation Fenton)
$[\text{Fe}^{2+}]_0$	concentration du ferreux initiale
$[\text{H}_2\text{O}_2]_0$	concentration de peroxyde d'hydrogène initiale
h	heure
INRS-ETE	Centre Eau Terre Environnement de l'INRS
K	indice de consistance
$k_L a$	coefficient volumétrique de transfert de l'oxygène
K_{ow}	coefficient de partage octanol/eau
MES	matière en suspension
MV	matière volatile
MVF	matière volatile filtrable
MVES	matière volatile en suspension
MVT	matière volatile totale
μ_m	taux de croissance spécifique maximal
n	indice de comportement de l'écoulement
N	azote
P	phosphore
PEC	polymères extracellulaires
PVA	produits à valeur ajoutée
PVC	Polyvinyl chlorure (polychlorure de vinyle)
RS	raw sludge (boue non traitée)
ST	solides totaux
TRB	temps de rétention des boues
UFC	unités formatrices de colonies
UI	unité internationale
UIS	ultrasonicated sludge (boue traitée par l'ultrasonification)

Résumé

La bioconversion des boues d'épuration en produits à valeur ajoutée est considérée comme une approche éco-respectueuse de l'environnement et économique pour la gestion de ce type de déchets. Toutefois, la biodégradabilité limitée des boues d'épuration nécessite l'application de prétraitement afin d'améliorer le rendement de la bioproduction à base des boues. De plus, la quantité grandissante de composés organiques toxiques dans les boues est une préoccupation pour les bioproduits fabriqués à partir des boues et peut compliquer l'homologation. L'objectif principal du projet est d'étudier l'effet du prétraitement sur l'amélioration de la bioconversion des boues d'épuration en produits à valeur ajoutée (PVA) et l'élimination simultanée des polluants organiques. Les méthodes de prétraitement ont été axées sur l'ultrasonification comme un processus mécanique et l'oxydation de Fenton comme un processus chimique. L'optimisation des procédés de prétraitement pour l'amélioration de la biodégradabilité des boues a été réalisée. Le changement des caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques de la boue avec le prétraitement a également été étudié. Cela a permis de déterminer l'effet du prétraitement sur l'accessibilité des éléments nutritifs des boues pour la dégradation microbienne. L'effet du prétraitement sur la production des produits à valeur ajoutée de boues a été évalué par l'étude de la fermentation de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en utilisant les boues prétraitées comme matières premières. En outre, la présence et le comportement du phtalate de di-(2-éthylhexyle) dans les boues avant et après le prétraitement et la fermentation de Bt ont été étudiés pour évaluer le rôle du prétraitement sur la détoxification et l'enlèvement du phtalate pour la valorisation des boues.

L'optimisation des procédés de prétraitement, soit l'ultrasonification et l'oxydation de Fenton, a été effectuée en utilisant la méthodologie de réponse en surface avec un plan composite centré. L'effet des processus de prétraitement a été évalué par les augmentations de la solubilisation (en termes de demande chimique en oxygène soluble) et de la biodégradabilité (en termes de consommation de solides totaux-ST dans la digestion aérobie) des boues d'épuration. L'ultrasonification a été effectuée à une fréquence de 20 kHz avec une sonde à ultrasons. Différentes concentrations en ST des boues d'épuration, intensités ultrasoniques, temps d'exposition ont été étudiées pour l'optimisation. Les conditions optimales du prétraitement par l'ultrasonification ont été

0,75 W/cm² d'intensité, 60 min de temps d'exposition et 23 g/L de ST. La solubilisation et la biodégradabilité étaient de 45,5 % et 56 %, respectivement.

L'optimisation de l'oxydation Fenton a été effectuée avec cinq paramètres, soit la concentration en peroxyde d'hydrogène (volume de H₂O₂ par g de matière en suspension-MES), le rapport de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène et de la concentration initiale de métaux ferreux, le temps de réaction, la température de réaction et la concentration en ST des boues. La plus haute solubilisation a été de 81% à des conditions de 0,01 mLH₂O₂/gMES, 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, de 25 g/L ST, à 70°C et en 120 min. Également, la plus haute biodégradabilité de 74% a été obtenue dans des conditions similaires de la concentration de H₂O₂, du rapport de [H₂O₂]₀-à-[Fe²⁺]₀, et de la concentration en ST, mais à plus basse température de 25 °C et en plus courte durée de temps de 60 min par rapport à des conditions optimales de la solubilisation.

Pour l'évaluation de l'effet de l'ultrasonification et l'oxydation Fenton sur la production de PVA de boues, la fermentation de Bt en fiole Erlenmeyer en utilisant de la boue non traitée (raw sludge-RS) et des boues traitées par l'ultrasonification (ultrasonicated sludge-UIS) et l'oxydation Fenton (Fenton oxidized sludge-FS) comme matière première a été effectuée. Les boues ont été prétraitées à des conditions optimales de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton. L'amélioration de la production des PVA par le prétraitement a été évaluée par la croissance de Bt, soit le nombre des cellules et la sporulation. Les nombres les plus élevés de cellules totales ont été observés à 30 h de fermentation : 1,44 x 10⁸ UFC mL⁻¹, 4,08 x 10⁸ UFC mL⁻¹, et 1,63 x 10⁹ UFC mL⁻¹ pour RS, UIS et FS, respectivement. Après 48 h de fermentation, 96% des cellules de Bt dans FS avaient sporulé Quant à UIS et à RS, seulement 90% et 84% de cellules ont sporulé, respectivement. De plus, la plus haute valeur du taux de croissance spécifique maximale (μ_m) de Bt a été atteinte pour FS (0,41 h⁻¹), suivie par UIS (0,33 h⁻¹) et RS (0,32 h⁻¹). Ainsi, l'oxydation classique Fenton est plus prometteur que le traitement chimique pour la production des biopesticides de Bt à base de boues d'épuration par rapport à l'ultrasonification, comme traitement physique.

Les propriétés rhéologiques des boues non traitées et des boues traitées par l'ultrasonification et l'oxydation Fenton ont été étudiées. Les boues ont été traitées dans des conditions optimales de l'ultrasonification et l'oxydation Fenton. Les boues non

traitées et traitées avaient un comportement non newtonien avec rhéofluidification ainsi que des propriétés thixotropiques pour des concentrations en ST de 10 g/l à 40 g/L. Les modèles rhéologiques, soit Plastique de Bingham, modèle de Casson, modèle de NCA/CMA Casson », Pâte IPC, et Loi de Puissance ont également été étudiés pour caractériser les propriétés d'écoulement des boues. Parmi les modèles rhéologiques étudiés, Loi de Puissance s'est avéré la plus importante pour décrire la rhéologie des boues. Les prétraitements ont entraîné une diminution de la pseudoplasticité des boues en raison de la baisse de l'indice de consistance K variant de 42,4 à 1188; de 25,6 à 620,4 et de 52,5 à 317,9. Cette diminution est aussi due à l'augmentation de l'indice de comportement de l'écoulement n changeant de 0,5 à 0,35; de 0,62 à 0,55; et de 0,63 à 0,58, pour RS, UIS et FS, respectivement aux concentrations en ST de 10 à 40 g/L. L'amélioration de la décantation, la diminution de la viscosité, et le changement de la taille des particules en fonction des processus de prétraitement des boues ont également été étudiés. L'oxydation Fenton a facilité la filtrabilité des boues en raison de la valeur du temps de succion capillaire qui ont été environ 50% des boues non traitées. Quant à l'ultrasonification, son énergie élevée a détérioré la filtrabilité. Le prétraitement a entraîné une diminution de la viscosité. La viscosité apparente a diminué en passant de 2,89 - 359,7 pour RS à 2,51 - 199,2 et 2,68 -108,3 mPa s pour UIS et FS, respectivement, entre 10 à 40 g/L de concentration en ST. L'ultrasonification a entraîné une plus grande diminution en taille des particules, tandis que, au contraire, l'oxydation Fenton a augmenté la taille des particules. Parmi RS, UIS et FS, le pourcentage de volume de particules de petite taille (inférieure à 10 μm) a été le plus élevé (0,54% - 0,38%) pour UIS à des concentrations en ST de 10 à 40 g/L, alors que le volume occupé par les grosses particules (supérieures à 250 μm) a été la plus prononcée pour FS (0,89 - 5,62%) à une concentration en ST de 10 à 40 g / L. Le prétraitement a modifié les propriétés rhéologiques des boues d'épuration résultant en l'amélioration de l'assimilation des nutriments par les microorganismes pour la valorisation des boues.

L'étude systématique (avant et après le prétraitement) de la dégradation aérobie lors de la fermentation de Bt) en présence du phtalate de di-(2-éthylhexyle) (DEHP) et de ses métabolites, soit le 2-éthylhexanol, le 2-éthylhexanal, et l'acide 2-éthylhexanoïque dans les boues d'épuration a été effectuée. Le DEHP et l'acide 2-éthylhexanoïque ont été observés à des concentrations importantes. Quant au 2-éthylhexanol et au 2-éthylhexanal, ils ont été observés à une très faible concentration dans des boues non traitées et traitées par

l'ultrasonification et l'oxydation Fenton. Lors de la dégradation aérobie, les microorganismes indigènes des boues ont été responsables de la biodégradation du DEHP, résultant en des enlèvements en masse du DEHP de 72%, 89% et 85%, et de l'acide 2-éthylhexanoïque de 71%, 84%, 79%, respectivement pour RS, UIS et FS. Ce travail a permis aussi de démontrer que Bt peut dégrader le DEHP, résultant en l'enlèvement en masse du DEHP de 21%, 40% et 30% pour RS, UIS et FS dans la fermentation. Cette bactérie permet donc de coupler la production à valeur ajoutée à l'enlèvement de micropolluants dans les boues d'épuration. Enfin, le prétraitement de l'untrasonification et de l'oxydation Fenton ont amélioré la biodégradabilité des boues d'épuration et la biodisponibilité des composés organiques cibles pour la digestion et la fermentation.

Abstract

Bioconversion of wastewater sludge (WWS) for value addition has been considered as economic and eco-friendly environmental approach for sludge management. However, limit on biodegradability of wastewater sludge requires the application of pre-treatment to enhance the yield of sludge-based bioproduction. Moreover, the occurrence of organic toxic compounds in wastewater sludge is a concern of environmental safety application of bioproducts produced from sludge. The principal objective of the project is to study the effect of pre-treatment on the improvement of bioconversion of wastewater sludge into value added products and simultaneous removal of organic pollutants. The pre-treatment methods were focused on ultrasonification as mechanical process and Fenton oxidation as chemical one. The optimization of the pre-treatment processes for improvement of biodegradability of sludge was carried out. The change of physicochemical and rheological characteristics of the sludge with the pre-treatment was also investigated to ascertain the effect of the pre-treatment on accessibility of nutrients of WWS for microbial degradation. The effect of the pre-treatment on the sludge based production of value added products was evaluated through the study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) fermentation using pre-treated sludge as raw materials. Additionally, the occurrence and behavior of bis(2-ethylhexyl) phthalate in the sludge before and after the pre-treatment and Bt fermentation were studied to assess the role of the pre-treatment on detoxification and removal of the phthalate for sludge value addition.

The optimization of the pre-treatment processes, i.e. ultrasonification and Fenton oxidation was performed by using response surface methodology with a 2^3 central composite design. The effect of the pre-treatment processes was assessed by the increases in solubilization (in terms of soluble chemical oxygen demand) and biodegradability (in terms of total solids (TS) consumption in aerobic digestion) of the wastewater sludge. Ultrasonification was carried out at frequency of 20 kHz using fully automated lab-scale ultrasonification equipment. Different wastewater sludge solids concentrations, ultrasonification intensities, and exposure times of ultrasonification were investigated for the optimization. The optimal conditions of ultrasonic pre-treatment were 0.75 W/cm² ultrasonification intensity, 60 min, and 23 g/L TS concentration. The solubilisation and biodegradability increased by 45.5 % and 56 %, respectively.

The optimization of Fenton oxidation pre-treatment was carried out with five parameters, i.e. concentration of hydrogen peroxide (volume of H₂O₂ per g suspension solids-SS), ratio of initial concentration of hydrogen peroxide and initial concentration of ferrous, reaction time, reaction temperature, and total solids concentration of sludge. The highest solubilization was 81 % at conditions of 0.01 mLH₂O₂/gSS, 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L TS, at 70 °C and in 120 min. Meanwhile, the highest biodegradability of 74 % was obtained under similar conditions of H₂O₂ concentration, [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, and TS, but at lower temperature of 25 °C and in shorter time duration of 60 min compared to the optimal conditions for solubilization.

To evaluate the effect of ultrasonification and Fenton oxidation on sludge based production of value added products, shake-flask fermentation of Bt using raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) as raw materials was performed. The ultrasonicated and Fenton oxidized sludges were pre-treated at the optimum conditions. The improvement of the production of value added products by the pre-treatment is assessed by the evaluation of the growth of the Bt, i.e. cell count and sporulation. Maximum total cell count observed at 30 h of fermentation attained 1.44 x 10⁸ CFU mL⁻¹, 4.08 x 10⁸ CFU mL⁻¹, and 1.63 x 10⁹ CFU mL⁻¹ for RS, UIS and FS, respectively. At 48 h of fermentation, 96 % of Bt cells in FS changed to spore, whereas in UIS and RS, there was only 90 % and 84 % of sporulation, respectively. Moreover, the highest value of maximum specific growth rates (μ_m) of Bt was attained for FS (0.41 h⁻¹), followed by UIS (0.33 h⁻¹) and RS (0.32 h⁻¹). Thus classic Fenton oxidation was demonstrated to be rather more promising chemical pre-treatment for Bt - based production of biopesticide from WWS when compared to ultrasonification as physical pre-treatment.

Rheological properties of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges were studied by using a rotational viscometer Brookfield DVII PRO+ equipped with Rheocalc32 software. Sludges were pre-treated at the optimal conditions of ultrasonification and Fenton oxidation. Pre-treated and raw sludges displayed non-Newtonian rheological behaviour with shear thinning as well as thixotropic properties for TS ranging from 10 g/L to 40 g/L. The rheological models, namely, Bingham plastic, Casson law, NCA/CMA Casson, IPC Paste, and Power law were also studied to characterize the flow of raw and pre-treated sludges. Among all rheological models, the Power law was more prominent in describing the rheology of the sludges. Pre-treatment processes resulted in a decrease in

pseudoplasticity of sludge due to the decrease in consistency index K varying from 42.4 to 1188, 25.6 to 620.4 and 52.5 to 317.9; and increase in flow behaviour index n changing from 0.5 to 0.35, 0.62 to 0.55 and 0.63 to 0.58, for RS, UIS and FS, respectively at solids concentration 10 – 40 g/L. The improvement of dewaterability, decrease in viscosity, and change in particle size as a function of pre-treatment process was also investigated. Fenton oxidation facilitated sludge filterability resulting in capillary suction time values which were approximately 50% of the raw sludge, whereas ultrasonification with high input energy deteriorated the filterability. Pre-treatment caused a decrease in viscosity: the apparent viscosity diminished from 2.89–359.7 for raw sludge to 2.51–199.2 and 2.68 - 108.3 mPa s for ultrasonicated and Fenton oxidized sludges, respectively at 10 - 40 g/L solids concentration. Ultrasonification resulted in greater decrease in particle size, while, on the contrary, Fenton oxidation increased the particle size: among RS, UIS and FS, volume percentage of small particle sizes (below 10 μm) was the highest (0.54% - 0.38 %) for UIS at TS concentration 10 – 40 g/L, whereas volume occupied by large particles (above 250 μm) was the most pronounced for FS (0.89 – 5.62 %) at TS concentration 10 – 40 g/L. Pre-treatment of wastewater sludge modified the rheological properties resulting in enhancement of assimilation of nutrients by microorganisms for further value addition.

The systematic study (before and after pre-treatment, aerobic degradation, and Bt-based fermentation) of the presence of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and its metabolites, namely 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanal, and 2-ethylhexanoic acid in WWS was carried out. DEHP and 2-ethylhexanoic acid were observed at significant concentration, meanwhile 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal were observed at minor concentration in raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges. In aerobic degradation, the indigenous microorganism presented in sludge are responsible for biodegradation of DEHP, resulting in mass removal of DEHP of 72 %, 89 %, and 85 %, and 2-ethylhexanoic acid of 71 %, 84 %, 79 %, respectively for RS, UIS and FS. Bt was found to be able to degrade DEHP, leading mass removal of DEHP of 21 %, 40 %, and 30 % for RS, UIS and FS in the fermentation. Then, it indicates that Bt can be used simulatenously for value added addition and micropolluants removal in sludge. Finally, ultrasonification and Fenton oxidation pretreatment had improved biodegradability of WWS and bioavailability of the target compounds for the digestion and the fermentation.



CHAPITRE 1 SYNTHÈSE

1.1. Introduction

Le traitement et l'élimination des boues d'épuration sont une problématique coûteuse pour les municipalités et certaines industries et doivent être faits en respect avec l'environnement. C'est un problème grandissant à l'échelle mondiale. La production de boues augmente au fur et à mesure que de nouveaux ouvrages d'épuration se construisent et que les normes sur la qualité de l'environnement deviennent plus strictes. Avec certains modes d'élimination traditionnels faisant face à de nombreuses restrictions, les producteurs de boues sont contraints de trouver des solutions économiques et innovantes tout en répondant à des pressions environnementales, réglementaires et publiques. Le recyclage et la réutilisation des boues d'épuration sont des options privilégiées pour le développement durable.

La valorisation des boues d'épuration en les utilisant comme matière première pour la production des produits commercialement importants comme des biopesticides, des engrais biologiques, des bioplastiques et des enzymes est une approche novatrice et durable de la gestion des boues (Vidyathi *et al.*, 2002; Yezza *et al.*, 2005; Ben Rebah *et al.*, 2007; Drouin *et al.*, 2007). Toutefois, la biodégradabilité des boues est un facteur limitant pour la bioproduction des produits à valeur ajoutée (PVA). L'application d'un prétraitement permet d'améliorer la biodégradabilité des boues en modifiant leurs propriétés physico-chimiques pour être favorable à l'utilisation microbienne dans la bioconversion subséquente (Müller, 2001). Dans un contexte de production à valeur ajoutée, plusieurs méthodes de prétraitement telles que l'hydrolyse thermo-alkaline et thermo-oxydation partielle ont été efficacement appliquées (Barnabé, 2004; Verma *et al.*, 2005; Drouin *et al.*, 2007). Le présent projet de doctorat est la suite de ces travaux. Il a pour but d'étudier en détails l'amélioration de la biodégradabilité des boues d'épuration pour la production des PVA par des méthodes de prétraitement supplémentaires, soit le traitement à ultrasons (processus physique) et l'oxydation Fenton (processus chimique).

En outre, en tenant compte du potentiel commercial des PVA de boues d'épuration, les contaminants contenus dans les boues, y compris les métaux, les pathogènes et les polluants organiques doivent respecter les normes environnementales en vigueur pour leur

utilisation en industries ou leur application dans l'environnement (Harrison *et al.*, 2006). Les métaux toxiques peuvent être enlevés avec un procédé de décontamination adéquat alors que les agents pathogènes sont éliminés à l'étape de stérilisation de la bioconversion (Barnabé *et al.*, 2009). Cependant, le devenir de certains polluants organiques est encore incertain. Il est possible que certains composés organiques considérés comme des perturbateurs endocriniens puissent être libérés dans l'écosystème par l'application des PAV produits dans des boues d'épuration. Ainsi, un autre but de ce travail est le comportement d'un polluant organique, soit le phtalate de bis (2-éthylhexyle) (DEHP : d'après l'appellation anglaise di(2-ethylhexyl) phthalate) classé comme un composé de perturbation endocrinienne (CPE), dans les boues d'épuration au cours des procédés de prétraitement de boues et de la production de PVA dans ces mêmes substrats.

Cette partie de la thèse est une synthèse des travaux. Elle comporte quatre parties. La première aborde la problématique de la biodégradabilité des boues d'épuration et le comportement du DEHP dans les boues d'épuration. La deuxième partie est une revue de littérature des effets des processus de prétraitement sur la biodégradabilité des boues et l'élimination du DEHP dans les boues. La troisième partie décrit les hypothèses scientifiques, les objectifs et l'originalité de la recherche. Enfin, la dernière partie exprime la méthodologie de la recherche, les résultats, les conclusions et les recommandations.

1.2. Problématique

1.2.1. Biodégradabilité des boues d'épuration

La biodégradabilité des boues d'épuration est un facteur clé pour l'efficacité des procédés biologiques de traitement (les digestions aérobie et anaérobie) ainsi que la production de produits à valeur ajoutée. En effet, la biodégradabilité reflète la facilité d'utilisation des boues comme substrat dans la bioconversion. La biodégradabilité représente la susceptibilité de substances organiques à leur altération par des processus microbiens. La biodégradabilité est influencée en partie par la biodisponibilité des substances organiques, La biodisponibilité d'un matériel indique avec quelle facilité une substance peut être absorbée par la cellule microbienne pour être métabolisée (Aquino *et al.*, 2008).

1.2.1.1. Faible biodisponibilité des boues

Bien que les boues d'épuration soient riches en éléments nutritifs (carbone-C, azote-N, phosphore-P et sels minéraux), la complexité de la structure des boues limite leur biodégradabilité et/ou la biodisponibilité pour l'utilisation microbienne dans des processus de traitement biologique. Des cellules, des polymères extracellulaires (PEC) et d'autres composantes de boues (de l'eau, des particules inorganiques, des cations polyvalents, ...) forment des amas (biofilms ou floccs) ayant une structure complexe et contribuent à leur forte résistance, leur viscosité élevée, leur grande taille des particules et leur faible homogénéité (Neyens *et al.*, 2004). Aussi, les éléments nutritifs dans des boues d'épuration sont insolubles et complexes car ils sont piégés dans des matières en suspension (amas de matière organique, PEC, cellules ou de débris cellulaires) ou adsorbés à leur surface (Verma *et al.*, 2007). Par conséquent, les nutriments et les composés organiques sont plus ou moins accessibles pour les micro-organismes.

1.2.1.2. Hydrolyse dans digestion anaérobie

La digestion anaérobie des boues comporte généralement trois étapes en commençant par l'hydrolyse à l'acidogénèse et en finissant avec la méthanogénèse. Plusieurs enzymes extracellulaires de bactéries anaérobies sont responsables de la solubilisation des particules insolubles et la décomposition biologique de polymères organiques en monomères ou dimères dans l'étape d'hydrolyse. Cependant, les limitations de l'insolubilité et l'hétérogénéité de matières organiques, l'apparence de substances non biodégradables et récalcitrantes, et de l'entrée dans les amas où plusieurs nutriments se trouvent, compliquent

et ralentissent la phase d'hydrolyse (Gavala *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Mao and Show, 2007).

1.2.1.3. Transfert de masse lors de la digestion aérobie

Dans la dégradation aérobie, y compris la digestion aérobie et la fermentation des boues pour des produits à valeur ajoutée, les limitations de la biodégradabilité restreignent non seulement l'hydrolyse enzymatique des particules des boues, mais aussi le transfert d'oxygène au cours du processus. Le problème dans l'aération de la masse est attribué à des caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques des boues, notamment la taille des particules et la viscosité.

L'agrégation des solides des boues fait en sorte que les particules aient une grande taille et contiennent une concentration élevée en matière organique. La présence de la phase solide contenant de grandes particules affecte l'aération et le transfert de l'oxygène en raison de la réduction de l'aire interfaciale de gaz-liquide à la suite du processus de coalescence (Ozbek and Gayik, 2001). De plus, il est connu que la viscosité du liquide influence fortement le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ($k_L a$) dans la dégradation aérobie. Les boues ont une rhéologie complexe (caractère non-newtonienne et nature pseudoplastique) et une viscosité élevée. Il en résulte une diminution de la diffusion de l'oxygène en phase aqueuse (l'air devient moins bien à distribuer tout au long du fluide sous une forme de grosses bulles), conduisant k_L à baisser plus rapidement, car la viscosité augmente. $k_L a$ diminue également lorsque la viscosité de la phase liquide augmente impliquant à l'augmentation de la taille des bulles d'air, entraînant une baisse de valeur de l'aire interfaciale (a) (Kilonzo and Margaritis, 2004). Par conséquent, les particules de grande taille avec haute viscosité entraînent de graves problèmes du transfert d'oxygène pendant la fermentation des boues et peuvent affecter la production des PVA.

Considérant que les nutriments se trouvent souvent dans des matières en suspension (MES) des boues, la croissance microbienne et la production des dérivés dans la fermentation des boues doivent être augmentées avec une forte concentration en matière (Brar *et al.*, 2005). Toutefois, l'augmentation de MES dans les boues modifie leurs caractéristiques rhéologiques avec une augmentation de viscosité. Tel que mentionné précédemment, une viscosité élevée des boues interfère avec le transfert de masse (oxygène et nutriments), ce

qui limite la capacité des microorganismes de consommer le substrat, conduisant à diminuer et/ou à inhiber la production de dérivés microbiens.

Ainsi, la biodisponibilité des nutriments dans les boues et la concentration en matière sont deux facteurs clés à considérer pour améliorer le rendement des PVA utilisant les procédés de fermentation conventionnels. L'application des méthodes de prétraitement aux boues d'épuration pour augmenter leur biodisponibilité des éléments nutritifs et modifier leurs caractéristiques rhéologiques pour permettre l'utilisation supérieure des MES améliorerait le rendement de production des PVA.

1.2.2. La présence potentielle de perturbateurs endocriniens dans les produits à valeur ajoutée issus de boues d'épuration

Un des problèmes majeurs liés à l'élimination des boues d'épuration ou à leur utilisation comme matière première pour la production des PVA est que les boues contiennent des contaminants comme des composés organiques toxiques. Ils peuvent présenter des risques potentiels pour l'environnement et la santé humaine. Ainsi, la présence de ces composés organiques toxiques dont certains sont considérés comme des polluants prioritaires doit être vérifiée.

1.2.2.1. Caractéristiques des composés organiques des boues

Les propriétés physico-chimiques de certains polluants organiques affectent leur dégradation dans les procédés de traitement. La limitation de la disponibilité des composés organiques pour la biodégradation résulte de leur adsorption sur des boues en raison de leur hydrophobicité élevée et de leur faible solubilité dans l'eau. En outre, des composés organiques comportant de hauts poids moléculaires et une structure chimique complexe avec des cycles aromatiques et des chaînes latérales longues sont souvent récalcitrants (Birkett and Lester, 2003; Harrison *et al.*, 2006). En ce qui concerne leur mécanisme de dégradation, certains polluants organiques sont dégradés en sous-produits parfois plus toxiques que les composés d'origine (Barnabé *et al.*, 2009).

1.2.2.2. La présence des phtalate dans les boues

Les phtalates sont classés comme perturbateurs endocriniens. Ce sont des substances chimiques de nature anthropiques qui préoccupent les instances environnementales en raison de leur utilisation dans une large gamme de produits à base de PVC et autres résines, plastifiants et insectifuges. Les plastifiants sont utilisés dans les matériaux de

construction, d'ameublement, le transport, l'habillement, et dans une moindre mesure, dans les emballages alimentaires et les médicaments. Les phtalates peuvent pénétrer dans l'environnement suite à des pertes lors de la fabrication et par le lessivage du produit final car ils ne sont pas liés chimiquement à la matrice polymère. Ils s'accumulent dans les boues d'épuration des eaux usées en raison de leur faible solubilité dans l'eau et de leur forte hydrophobicité, et ont tendance à s'adsorber sur les sédiments et matières en suspension (Scrimshaw et Lester, 2003; Abad *et al.*, 2005; Barnabé *et al.*, 2009).

1.2.2.3. Bis (2-éthylhexyl) phtalate, polluant prioritaire

Parmi les phtalates, le DEHP est considéré comme un polluant prioritaire pour les raisons suivantes:

- Le DEHP est l'un des plus importants des phtalates car il est utilisé comme plastifiants en grandes quantités (Gómez-Henz et Aguilar-Caballo, 2003);
- Sa récalcitrance est à cause de la longueur de la chaîne alkyle latérale qui influence la dégradation (Amir *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007);
- La biodégradation de ce composé produit des sous-produits, 2-éthylhexanol, 2-éthylhexanal et acide 2-éthylhexanoïque qui sont plus toxiques que le composé d'origine (Horn *et al.*, 2004; Nalli *et al.*, 2006a).

Ce plastifiant di-ester particulier est parmi les contaminants organiques les plus abondants dans les eaux usées urbaines et les boues d'épuration et a été classé comme polluant organique prioritaire par diverses instances environnementales (CEC, 2000; Scrimshaw et Lester, 2003). Par conséquent, il y a une possibilité que le DEHP et ses métabolites se dispersent dans l'environnement suite à l'application de PVA produits à partir des boues. La maîtrise et la surveillance des risques de libérer les contaminants organiques dans l'environnement après le traitement des boues d'épuration et leurs utilisations bénéfiques sont essentiels pour la gestion sécuritaire des boues ainsi que pour l'acceptation du public et des utilisateurs potentiels de PVA.

Ainsi, il est important de mener des études sur le comportement des perturbateurs endocriniens, pendant et après le prétraitement et bioconversion subséquente des boues en PVA afin d'appliquer des PVA exempts de ce type de contaminant.

1.3. Revue de littérature

1.3.1. La composition typique des boues d'épuration

Les boues d'épuration sont générées à partir du traitement des eaux usées municipales, industrielles et agricoles. Le présent travail est axé sur les boues d'épuration municipales qui sont des matières résiduelles obtenues à partir du traitement des stations d'épuration des eaux usées qui ont reçu des eaux usées des résidences, des établissements commerciaux, des industries ou des eaux pluviales qui entrent dans le système de collecte des eaux usées municipales. Ces boues contiennent de la matière organique et des nutriments pour diverses utilisations bénéfiques qui sont souvent des options d'élimination rentables et durables pour la gestion des boues.

Les boues sont constituées de matière organique, de micro-organismes vivants ou de débris cellulaires, de polymères extracellulaires, de cations polyvalents, de particules inorganiques, de particules colloïdales et de composés dissous. Plusieurs de ces constituants sont présents sous forme de floes. Les polymères extracellulaires jouent un rôle important dans la formation de floes. Ils sont présents en quantités variables dans les boues d'épuration. Les PEC sont principalement responsables de l'intégrité structurale et fonctionnelle des agrégats et sont considérées comme la clé des caractères physico-chimiques et biologiques. La structure générale de floe est chargée négativement et est le résultat d'interactions physico-chimiques entre des microorganismes (principalement des bactéries), des particules inorganiques (silicates, le phosphate de calcium et les oxydes de fer), des PEC et des cations multivalents. La présence de ces matières en suspension en grande quantité entraîne une forte viscosité et donne des particules de grande taille (Neyens *et al.*, 2004). La structure de floe des boues est donnée à la Figure 1.

En ce qui concerne la production des PVA, les boues contiennent une charge élevée de matière organique dans laquelle il y a beaucoup de nutriments pour supporter la croissance microbienne et la production de produits dérivés :

- La matière organique des boues est principalement constituée de protéines, d'hydrates de carbone, de lipides et de substances humiques. Les boues contiennent également des nutriments par exemple, de N et de P qui sont nécessaires à la croissance des microorganismes. La plupart de l'azote organique des boues se trouve dans la matière organique. En revanche, les formes inorganiques de l'azote

(NH₄ et NO₃) sont solubles dans l'eau. Le phosphore dans les eaux usées existe dans les deux formes organiques et inorganiques (Barnabé *et al.*, 2004; Neyens *et al.*, 2004).

- Les boues contiennent des métaux et des sels minéraux dont le potassium (K), calcium (Ca), magnésium (Mg), sodium (Na), cuivre (Cu), zinc (Zn), le molybdène (Mo), le fer (Fe), manganèse (Mn), et le cobalt (Co). Ces métaux sont essentiels pour la croissance et les activités des cellules microbiennes.

Les boues contiennent majoritairement de l'eau qui est divisée en différentes fractions: l'eau libre qui n'est pas attachée aux matières des boues et qui peut être séparée par simple décantation; l'eau interstitielle qui est piégée dans la structure des flocs ou de cellules et peut être libérée lorsque le floc est brisé ou la cellule est détruite; l'eau vicinale attachée aux particules par les forces capillaires; l'eau d'hydratation qui est chimiquement attachée aux particules et ne peut être retirée par la destruction thermo-chimique des particules (Barnabé, 2004, Yin *et al.*, 2004).

En résumé, les boues d'épuration contiennent des sources de C, de N, de P et minéraux pour la croissance microbienne, mais elles ne sont pas facilement disponibles pour les microorganismes. Pour la production de PVA, il est important d'utiliser le plein potentiel nutritif des boues d'épuration et d'obtenir un rendement maximal en termes de croissance cellulaire ou de production de dérivés microbiens. Ainsi, le prétraitement des boues est nécessaire afin de maximiser l'utilisation de leur valeur nutritive.

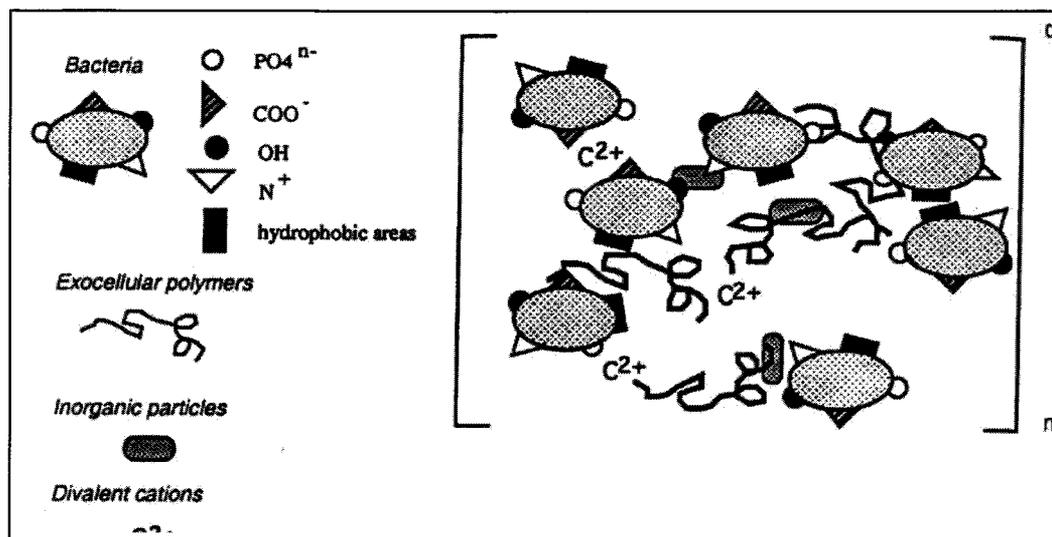


Figure 1 Structure proposée de floc des boues (Neyens et Bayens, 2003a)

1.3.2. Effet du prétraitement des boues d'épuration sur la production de produits à valeur ajoutée

Les prétraitements physico-chimiques, mécaniques et biologiques sont habituellement utilisés dans la station d'épuration ou des industries pour stabilisation et élimination des boues. Le prétraitement est principalement utilisé pour améliorer le rendement des processus de stabilisation tels que la digestion anaérobie ou aérobie. Il fait particulièrement augmenter la biodisponibilité des nutriments pour favoriser la croissance microbienne, ce qui favorise la réduction du volume des boues et du temps de rétention du processus de digestion ainsi que la production de méthane dans digestion anaérobie (Gavala *et al.*, 2003; Bougrier *et al.*, 2006). Il améliore les performances des procédés de déshydratation par la rupture des amas des boues et de libérer l'eau emprisonnée. Il réduit également la quantité d'agents de déshydratation ajoutés (Neyens *et al.*, 2004). En outre, les boues d'épuration sont prétraitées pour fournir des sources externes de carbone au processus de dénitrification dans les traitements biologiques (Müller, 2000; Liao *et al.*, 2005). Ainsi, le prétraitement est considéré comme un moyen de réduire la quantité de boues à gérer et leurs coûts d'élimination.

Tel que mentionné précédemment, la biodisponibilité des éléments nutritifs est un facteur clé de la production des PVA à partir des boues d'épuration. L'application d'un prétraitement est connue pour influencer la teneur et la biodisponibilité des nutriments ainsi que pour modifier les propriétés physico-chimiques des boues qui améliorent la biodégradabilité. L'application de prétraitement est ensuite appropriée pour améliorer le rendement des PVA en termes de croissance cellulaire et la formation de dérivés microbiens.

1.3.2.1. Solubilisation des matières organiques

Bien que les boues contiennent une forte charge organique, elle est piégée dans les floccs des boues en raison de l'agrégation de leurs composantes, principalement des cellules, des PEC, et de l'eau. Le processus de prétraitement des boues brise les floccs et détruit ensuite, les PEC ainsi que les parois cellulaires des microorganismes morts ou vivants et des débris cellulaires. Des substances dans les PEC et les cellules se libèrent, ce qui entraîne l'augmentation des protéines et des polysaccharides dans la phase aqueuse. Des particules des boues sont solubilisées partiellement et sont plus accessibles pour les microorganismes dans les processus biologiques subséquents (Scheminski *et al.*, 2000; Bougrier

et al., 2005; Tokumura *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2009). Selon la force du prétraitement, elles peuvent aussi être minéralisées. Le degré de solubilisation peut être évalué avec l'augmentation de la demande chimique d'oxygène soluble (DCOS) qui représente l'augmentation de la libération des substances organiques ou avec l'augmentation de la concentration de certains composants (protéines, polysaccharides et lipides) des boues en phase liquide (Wang *et al.*, 2006; Bougrier *et al.*, 2006; Aquino *et al.*, 2008). Ainsi, les processus de prétraitement peuvent solubiliser des matières organiques et des nutriments dans boues pour favoriser la dégradation microbienne et la fermentation des boues (Yezza *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2007).

1.3.2.2. Augmentation de la biodégradabilité des boues

La biodisponibilité de la matière organique et des éléments nutritifs des boues prétraitées est améliorée grâce à la désintégration des floccs et la lyse des cellules. De plus, des processus de prétraitement physico-chimiques et biologiques peuvent réduire la taille des composés organiques et transformer des composés réfractaires et difficiles à biodégrader en plus composés plus facilement biodégradables (Neyens *et al.*, 2003a; Aquino *et al.*, 2008).

La biodégradabilité des boues peut être évaluée par la mesure des concentrations des produits tels que la production de bioxyde de carbone (CO₂), la consommation d'oxygène, et la consommation de composés organiques et la production de biogaz (essentiellement du méthane dans le processus anaérobie).

Dans le cas de la production de PVA utilisant des boues comme substrat, le prétraitement est appliqué pour transformer les boues en composés solubles biodégradables dans le but d'améliorer le rendement de la production de cellules et/ou de dérivés microbiens (Yezza *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2007).

1.3.2.3. Modification des caractères physiques des boues

La taille des particules et la rhéologie sont des propriétés physiques importantes des boues lors de la bioconversion car ils peuvent influencer deux paramètres clés de la croissance microbienne, soit le transfert de l'oxygène et des éléments nutritifs du milieu vers les cellules. Ils peuvent également interférer avec les activités enzymatiques (Brar *et al.*, 2007; Drouin *et al.*, 2007).

La viscosité élevée et la grande taille des particules des boues sont principalement causées par la présence des PEC qui sont responsables de l'intégrité structurale et fonctionnelle des amas des boues (voir précédemment). Les prétraitements brisent les floccs et diminuent la viscosité des boues. Par la suite, la diffusion de l'oxygène est améliorée alors que la taille des bulles de l'air augmente en raison de la diminution de la viscosité. Cela conduit à une haute valeur de $k_L a$ lors du processus de fermentation, ce qui indique une bonne performance de l'activité biologique et potentiellement de meilleurs rendements en PVA. Aussi, la diminution de la taille des particules des boues à cause de la rupture structurale des floccs conduit à la réduction de l'aire interfaciale de gaz-liquide dans un milieu, ce qui améliore le transfert de l'oxygène.

Prétraitement peut également modifier la complexité rhéologique des boues d'épuration afin de faciliter la bioproduction de produits à valeur ajoutée (Brar *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2007). L'hydrolyse alcaline thermique diminue le comportement non-newtonien des boues (indiqué par la non-linéarité de la relation de taux de cisaillement - stress de cisaillement), afin d'améliorer l'assimilation des nutriments par les microbes. Aussi le prétraitement diminue la pseudoplasticité (la viscosité diminue avec le taux de cisaillement) des boues en augmentant l'indice de comportement de l'écoulement et baissant l'indice de consistance du modèle « Power law » qui a été démontré prééminent dans la description de la rhéologie des boues. Cela améliore le transfert de masse et de chaleur ainsi que la fluidité des boues d'épuration pour la bioproduction et de transport à travers la chaîne de traitement.

Les prétraitements thermochimiques et chimiques peuvent améliorer la vitesse de transport des éléments nutritifs par le bris et la transformation des molécules de grandes tailles ainsi que des molécules non stériques incompatibles ou hautement cristallines qui ne peuvent pas être facilement transportées dans des cellules (Barnabé, 2004).

Certaines méthodes chimiques de prétraitement pourraient réduire des concentrations en métaux lourds présents dans des boues ou changer leurs formes qui sont moins toxiques pour les micro-organismes (Andrews *et al.*, 2006). Dans des procédés de traitement biologique de boues, le prétraitement peut aussi libérer des enzymes extracellulaires, toujours actives, qui sont piégés dans les boues (Tiehm *et al.*, 2001; Whiteley et Lee, 2006). Cela contribue à la dégradation biologique des boues (Guang-Hui *et al.*, 2009). Or,

elles seront certainement détruites ou désactivées dans un procédé de production à valeur ajoutée où une stérilisation des boues est requise.

Ainsi, le prétraitement influence favorablement le transfert de masse, les activités enzymatiques et métaboliques des microorganismes et la détoxification de métaux lourds de façon à faciliter le traitement biologique des boues ainsi que la production à valeur ajoutée.

1.3.3. Méthodes de prétraitement

1.3.3.1. Les processus physiques

1.3.3.1.1. Ultrasonification

Le mécanisme des méthodes mécaniques de prétraitement est généralement fondé sur la rupture des parois des cellules microbiennes par des contraintes de cisaillement (Müller, 2000; Climent *et al.*, 2007). Parmi les méthodes mécaniques de prétraitement des boues, l'ultrasonification est l'une des méthodes les plus efficaces pour briser des cellules des boues en raison de divers impacts de la cavitation (Weemaes *et al.*, 1998).

1.3.3.1.1.1. Le mécanisme de l'ultrasonification

Un ultrason est une onde de pression qui se propage dans un milieu en générant une grande quantité d'énergie. Cela entraîne la génération, l'élargissement et l'effondrement violent de gaz et de bulles de vapeur (appelé «cavitation acoustique»). Une forte température (jusqu'à 5000 K) et des tourbillons avec une forte pression turbulente de taille 5-100 μm (plusieurs centaines d'atmosphères) sont générés à proximité des bulles, ce qui induit de nombreux effets physico-chimiques (Tiehm *et al.* 2001; Dewill *et al.*, 2006). La cavitation entraîne : (1) l'accélération de réactions chimiques à la suite d'une température et une pression élevées localement; (2) des forces de cisaillement extrême dans le liquide, ce qui attaquent de façon mécanique les composantes du milieu; et (3) la formation de radicaux hautement réactifs (H^\bullet et OH^\bullet), ce qui facilite davantage les réactions chimiques pour détruire des contaminants organiques (Dewill *et al.*, 2006). Le processus de dégradation peut se produire dans une gamme de fréquences d'ultrasons de 20 kHz à environ 1 MHz. L'efficacité la plus élevée de réactions sonochimiques a été observée à plus de 100 kHz (Hua et Hoffmann, 1997; Périer et Francony, 1997), tandis que l'effet des forces de cisaillement hydromécanique par cavitation se produit plus facilement à une fréquence de 20 - 40 kHz (Chu *et al.*, 2001; Tiehm *et al.*, 2001; Dewill *et al.*, 2006).

1.3.3.1.1.2. Les paramètres de l'ultrasonification affectant la désintégration des boues

À basse fréquence, les forces de cisaillement hydromécanique provoquent la rupture des floccs, la lyse des cellules des boues ainsi que la libération de substances organiques dans la phase liquide qui améliore la solubilité des boues. De nombreuses études ont montré que la densité et l'intensité de puissance, le temps d'exposition, la température et la nature des boues sont les facteurs cruciaux ayant des conséquences pour la désintégration des boues. L'ultrasonification des boues biologiques comporte plusieurs étapes (Chu *et al.*, 2001).

- Dans la première phase (0 - 20 min), les forces mécaniques brisent des floccs poreux en petites particules;
- Dans la deuxième phase (20 - 60 min) l'ultrasonification entraîne une lyse cellulaire et libère des polymères extracellulaires;
- La transformation de l'état solide de composés organiques en une forme soluble peut être continuellement induite par la température de la masse élevée au cours de l'ultrasonification dans la phase finale.

L'intensité et la densité de puissance ont une incidence significative sur la désintégration des boues par ultrasons (Grönroos *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Grönroos *et al.* (2005) ont noté que l'efficacité énergétique avec une haute puissance ultrasonique et un court temps de traitement était plus élevée en comparaison avec une faible puissance et un long temps de traitement. Les membranes des micro-organismes ont différentes résistances contre des forces extérieures alors que les cellules bactériennes plus complexes nécessitent une alimentation en énergie élevée pour briser leur membrane.

Dans le processus de désintégration des boues par ultrasons, il est nécessaire de fournir suffisamment d'énergie pour briser des floccs et lyser des cellules. Le niveau de solubilisation des boues est proportionnelle à l'énergie d'entrée de l'ultrasonification (Tiehm *et al.*, 2001; Bougrier *et al.*, 2005). En outre, l'énergie d'entrée spécifique (E_s) a été définie en utilisant la puissance ultrasonique (P), le temps d'exposition (t), le volume d'échantillon (v) et la concentration en solides totaux (ST) ($E_s, \text{kJ/kg ST} = Pt/vST$) (Onyeche *et al.*, 2002; Bougrier *et al.*, 2005). Selon l'étude de Bougrier *et al.* (2005), la concentration en matière soluble (surnageant de centrifugation) a augmenté alors que la concentration en particules fines (solides dans centrifugation) a diminué avec l'énergie d'entrée spécifique. Une augmentation de la solubilisation de la DCO et de l'azote s'est

produite alors qu'une amélioration de la biodégradabilité des boues en termes de production de biogaz est survenue.

1.3.3.1.1.3. Effet de l'ultrasonification sur le traitement des boues

Plusieurs travaux sur le prétraitement ultrasonique des boues d'épuration sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 Littérature sur les résultats des processus de prétraitement ultrasonique

Référence	Optimale paramètre					Résultats
	Fréquence (kHz)	Intensité (W/cm ²)	Densité (W/mL)	Temps (min)	Énergie d'entrée (kJ/kg ST)	
Naddeo <i>et al.</i> , 2009	20		0,2	30	12 178	Augmentation de 98 mg /L à 1598 mg /L des substances organiques solubilisées, suivie par une réduction de 700 mg/L après une digestion anaérobie de 9 jours
Liu <i>et al.</i> , 2009		0,35	0,25	15		Augmentation de 67,6% de la biodégradabilité sous des conditions en anaérobie
Kidak <i>et al.</i> , 2009					150 000	50-60% de réduction de la demande d'oxygène chimique
Yu <i>et al.</i> , 2008	20		3	10		Réduction de 42,7% des MES par rapport à 20,9% du contrôle lors d'une digestion aérobie de 10,5 jours
El-Hadi <i>et al.</i> , 2007					11 000	Amélioration de 42,2% de la solubilisation des matières volatiles (MV); amélioration de 30,8% et 16,4% de la production de biogaz, 53,9% et 63,5% de la réduction de naphtalène, respectivement dans des digestions anaérobies mésophiles et thermophiles
Bougrier <i>et al.</i> , 2005					10 000	Augmentation de 4 à 32% de la DCOS, de 3,1% à plus de 40% de l'azote total soluble; le volume du biogaz était de 1,4 fois plus élevé que le contrôle.
Tiehm <i>et al.</i> , 2001	41					Augmentation de 33,7% de MV dégradées; 4,15 L de la production de biogaz par rapport à 2,93 L du contrôle lors de la digestion anaérobie.

Les ultrasons sont considérés comme une technologie propre dans le traitement des boues pour les raisons suivantes: (i) méthode appropriée pour la désintégration des boues conduisant à haut degré de dégradation biologique; (ii) pas de consommation de produits chimiques ni de formation de sous-produit. Toutefois, le principal inconvénient de l'application des ultrasons à l'échelle industrielle pour le traitement des boues est la forte demande en énergie et donc des coûts élevés de l'énergie électrique et de fonctionnement.

1.3.3.1.2. Hydrolyse thermique

1.3.3.1.2.1. Paramètres de l'hydrolyse thermique

Le principal paramètre du traitement thermique est la température, suivi du temps de traitement qui varie souvent entre 30-60 min (Climent *et al.*, 2007; Bougrier *et al.*, 2007). Les températures de traitement les plus courantes sont entre 60 et 180°C. Les traitements appliqués à des températures inférieures à 100°C sont considérés comme traitement thermique à faible température. Les températures de plus de 200°C ont été trouvées responsables de la formation des composés réfractaires liés à des réactions de Maillard ou intermédiaires toxiques (Neyens et Bayens, 2003a; Wilson et Novak, 2009).

Le procédé thermique le plus courant est l'injection directe de vapeur à des températures et pressions élevées. Récemment, le traitement aux micro-ondes (MW), qui est un rayonnement électromagnétique ayant une fréquence d'oscillation de 0,3 à 300 GHz, est considéré comme une méthode alternative à un prétraitement thermique classique pour économiser l'énergie. Les principaux avantages du chauffage à micro-ondes sont l'uniformité de chauffage et le contrôle précis de la température de traitement (Eskicioglu *et al.*, 2006; Toreci *et al.*, 2009).

L'hydrolyse thermique est souvent utilisée pour améliorer l'efficacité d'un processus de dégradation biologique subséquente comme la réduction du volume des boues et l'augmentation de la production de biogaz lors de la digestion anaérobie ou encore pour le recyclage des éléments utiles comme l'azote et le phosphore lors du traitement des eaux usées. Il y a aussi d'autres applications comme l'amélioration de la déshydratation des boues et la réduction des pathogènes (Chu *et al.*, 2002b; Liao *et al.*, 2005)

1.3.3.1.2.2. Effet de l'hydrolyse thermique sur la biodégradabilité des boues

L'hydrolyse thermique cause la destruction des floccs et la perturbation des cellules ainsi que la dépolymérisation des biopolymères. Elle conduit à un niveau élevé de solubilisation et d'hydrolyse des composants. Pour ces raisons, ce prétraitement a été appliqué afin d'accroître leur biodégradabilité lors de leur traitement aérobie et anaérobie (Li et Noike, 1992; Chu *et al.*, 2002b; Liao *et al.*, 2005; Salsabil *et al.*, 2010). Les travaux récents sur l'amélioration de la dégradation biologique des boues d'épuration avec prétraitement thermique, sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 Littérature sur les résultats des processus de prétraitement thermique

Référence	Paramètres optimaux			Résultats
	Type de chauffage	Température (° C)	Temps (min)	
Mottet <i>et al.</i> , 2009	Autoclave	165		18 % de la solubilisation de la DCO, 15 % de la solubilisation des MV; augmentation de la biodégradabilité de 47 à 61% lors de la production de méthane.
Wilson and Novak, 2009	Moufle	220		Caramélisation des hydrates de carbone.
Toreci <i>et al.</i> , 2009	Micro-onde de 3,75 ° C/min d'intensité	175		Plus de 83 % de la production de biogaz quotidien et 93 % la production de biogaz par quantité des MV ajoutée lors d'une digestion anaérobie d'une (temps de rétention des boues ou TRB de 5 jours) que du contrôle (TRB de 20 jours).
Ahn <i>et al.</i> , 2009	Micro-ondes à 2450 MHz et 700W		15	Augmentation du degré de solubilisation de 2% à 22%; augmentation du potentiel acidogène biochimique de 3,58 à 4,77 g de DCO par litre.
Climent <i>et al.</i> , 2007	Micro-ondes	134	90	914% d'accroissement maximal du ratio de matières volatiles filtrables à matières volatiles totales (MVF / MVT).
		70	540	0,52 de production maximale de biogaz
Bougrier <i>et al.</i> , 2007	Autoclave	190		Amélioration de la dégradation des lipides de 84% (67 % pour le contrôle), des hydrates de carbone de 82 % (56 % pour le contrôle), des protéines de 46 % (35 % pour le contrôle); augmentation de 25 % de production de méthane
Eskicioglu <i>et al.</i> , 2006	Autoclave	96		361% de DCO soluble et 475 % de production de biogaz cumulatif plus élevés que le contrôle
	Micro-ondes	96		143% de DCO soluble et 211 % de production de biogaz cumulatif plus élevés que le contrôle

En ce qui concerne la culture de microorganismes industriels pour l'obtention de produits à valeur ajoutée à partir des boues, l'hydrolyse thermique a certains avantages sur d'autres méthodes: (i) élimination des agents pathogènes et des odeurs des boues; (ii) possibilité de réaliser le traitement thermique dans la cuve stérilisable où la culture de microorganismes peut être faite. Quoiqu'il y ait une formation potentielle de composés réfractaires, cela peut être évité si les températures sont inférieures à 160°C.

1.3.3.2. Les processus chimiques

1.3.3.2.1. Ozonation

L'ozone est un puissant oxydant qui peut agir avec un large éventail de composés organiques et inorganiques. L'ozone a une forte activité lytique cellulaire et peut oxyder davantage des substances organiques libérées des cellules (Chu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). En ce qui concerne du prétraitement des boues, le but de l'ozonation est de provoquer l'hydrolyse et l'oxydation partielle de la matière organique en améliorant la biodégradabilité des boues pour des processus biologiques subséquents (Liu *et al.*, 2001; Carballa *et al.*, 2007; Manterola *et al.*, 2008; Chu *et al.*, 2008). Il existe deux voies de réaction de l'ozonation, soit directe et indirecte (radicaux libres), conduisant à la formation

de produits d'oxydation différents (Pera-Titus *et al.*, 2004). À faible pH (pH <4), l'ozone réagit exclusivement avec des composés ayant de groupes fonctionnels par des réactions sélectives comme de réactions électrophiles, nucléophiles ou d'addition dipolaire (ozonation directe). À pH plus élevé, l'ozone se décompose, produisant des radicaux hydroxyles, qui sont très oxydantes et réagissent d'une manière non sélective avec une large gamme de composés organiques et inorganiques dans l'eau (ozonation indirecte). Dans la gamme de pH 4-9, l'ozonation mixte a été reportée. En outre, la combinaison de l'ozone au peroxyde d'hydrogène ainsi que l'ozonation photolytique produisant des radicaux hydroxyles sont des méthodes efficaces pour l'oxydation et la destruction des toxiques organiques réfractaires dans le traitement des eaux usées et des boues d'épuration (Pera-Titus *et al.*, 2004). Les récents travaux sur l'amélioration de la solubilisation et la biodégradabilité des boues d'épuration par l'ozonation sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 Littérature sur les résultats des processus de l'ozonation

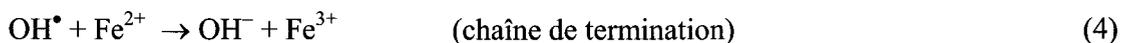
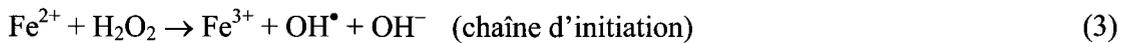
Référence	Dose d'ozone	Résultats
Salsabil <i>et al.</i> , 2009	de 0.1 g O ₃ /g solides totaux	Amélioration de la réduction de MES de 14% et 12,5%, respectivement dans les digestions aérobie et anaérobie.
Zhang <i>et al.</i> , 2009	50 mgO ₃ /g SS	46,7% de degré de la désintégration, diminution de 49,1% de ST et 45,7% de MV; augmentation de 699%, 169%, 237%, 602%, 528% et 556%, respectivement de DCO soluble, d'azote total, de phosphore total, de protéines, de polysaccharides et d'acides nucléiques dans le surnageant.
Carballa <i>et al.</i> , 2007	20 mg O ₃ /g MES	Solubilisation de 8% de MV et 60 % de DCO.
Bernal-Martinez <i>et al.</i> , 2007	0,1 g O ₃ /g ST	Amélioration de l'enlèvement des hydrocarbures aromatiques polycycliques lors de la digestion anaérobie des boues.
Bougrier <i>et al.</i> , 2006	0,16 gO ₃ / g ST	Augmentation de 15 % de biodégradabilité (en comparant le volume de biogaz produit de la boue ozonée sur le volume de biogaz produit de l'éthanol), amélioration de biogaz de un facteur de 1,25 par rapport à biogaz produit du contrôle.
Goel <i>et al.</i> , 2003	0,05 gO ₃ /g ST	Solubilisation de 37 % de ST; minéralisation de 5 % de MVT; amélioration de 59 % de réduction de MVT (31 % du contrôle) lors de leur digestion anaérobie.
Yeom <i>et al.</i> , 2002	0,1 g O ₃ /g MES	77 % de boues ozonées biodégradées (36 % du contrôle) en 15 jours lors de leur digestion aérobie.
Weemaes <i>et al.</i> , 2000	de 0,1 g O ₃ /g DCO	La production de méthane a été multipliée par un facteur de 1,8 et le taux de production de méthane a été 2,2 fois plus élevé par rapport au contrôle lors de la digestion anaérobie.

Les inconvénients de l'application de l'ozonation comme prétraitement des boues sont les suivants: (i) possibilité de production de sous-produits qui sont toxiques et réfractaires pour la croissance microbienne; (ii) coût élevé du fonctionnement des équipements générant l'ozone. Toutefois, l'ozonation est un prétraitement prometteur de la capacité oxydative élevée et l'absence de produits chimiques.

1.3.3.2.2. Oxydation Fenton

1.3.3.2.2.1. Mécanisme

L'oxydation Fenton est classée comme un procédé d'oxydation avancée car l'oxydation Fenton est capable de générer des radicaux libres hydroxyles (OH^\bullet), un agent oxydant très puissant et non sélectif avec un potentiel d'oxydation de 2,8 V (Neyens et Baeyens, 2003b; Andrews *et al.*, 2006; Bautista *et al.*, 2008). Au cours de l'oxydation, le fer ferreux (Fe^{2+}) initie et catalyse la décomposition de H_2O_2 , aboutissant à la production de radicaux hydroxyles qui consiste une séquence de réactions complexes dans une solution aqueuse (Eq 3-4) (Neyens et Bayens, 2003b).



En outre, les radicaux hydroxyles peuvent davantage oxyder des matières organiques (RH) par l'abstraction de radicaux organiques produisant du proton (R^\bullet), qui sont très réactifs et peuvent subir une oxydation supplémentaire (Eq 5).



Si les concentrations des réactifs ne sont pas limitatives, de matières organiques peuvent être totalement oxydées par la conversion totale en CO_2 et en eau (Neyens et Bayens, 2003b).

Les radicaux hydroxyles passent facilement à travers la membrane de cellules microbiennes dans les boues, conduisant à une oxydative décomposition de la paroi cellulaire. Par conséquent, les substances organiques sont libérées des cellules microbiennes dans la phase liquide. De plus, les radicaux hydroxyles oxydent les composés récalcitrants des boues en des composés biodégradables (Lopes de Morais et Zamora, 2005).

Ainsi, l'oxydation Fenton est utilisée comme un moyen efficace de prétraitement afin d'améliorer la biodégradabilité et de réduire la toxicité des eaux usées et des boues

d'épuration pour les traitements biologiques subséquents (Andrews *et al.*, 2006; Comminellis *et al.*, 2008; Eskicioglu *et al.*, 2008).

1.3.3.2.2.2. Paramètres de l'oxydation Fenton

L'efficacité de l'oxydation Fenton dépend de la production et la consommation de radicaux hydroxyles qui dépendent des paramètres d'opération dont le pH, les concentrations et les proportions des réactifs (H_2O_2 , Fe^{2+}), la température ainsi que le type et la quantité de constituants organiques ou inorganiques des boues (Yoon *et al.*, 2001; Bautista *et al.*, 2008).

Le H_2O_2 est le réactif principal de la production de OH^\bullet (équation 3). Cependant, le H_2O_2 résiduel n'est pas recommandé car il se transforme en récupérateur de OH^\bullet tel que décrit dans les équations 6 à 8 (Neyens et Bayens, 2003b; Bautista *et al.*, 2008) :



De plus, H_2O_2 est un fort oxydant. Une forte concentration en H_2O_2 pourrait causer une oxydation complète des boues en CO_2 et des minéraux (Cacho Rivero et Suidan, 2006).

La quantité de composés organiques dans les boues est l'un des facteurs clés dans l'oxydation Fenton en raison de leur rôle de la récupération de OH^\bullet . L'effet des composés organiques sur la production de OH^\bullet est de les consommer et de produire des radicaux organiques qui participent au mécanisme d'oxydoréduction de l'espèce de fer dans le système de Fenton (Yoon *et al.*, 2001).

Ainsi, la dose du H_2O_2 doit être fixée en fonction de la concentration initiale des polluants. Il est fréquent d'utiliser une quantité de H_2O_2 correspondant au ratio théorique de H_2O_2 stoechiométrique à la DCO ou à la teneur en matière dans le cas du traitement des boues.

Il a été observé que le rapport $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ -à- $[\text{Fe}^{2+}]_0$ joue un rôle important dans les interactions stoechiométriques des réactifs de Fenton et des matières organiques présentes dans les boues. Le rapport molaire des réactifs Fenton peut être spécifique à chaque type de boues

ainsi que chaque quantité et qualité des boues à traiter (Yoon *et al.*, 2001; Tokumura *et al.*, 2009). La réaction de Fenton a une activité catalytique maximale à pH 2.8-3.0, mais diminue considérablement avec une augmentation ou une diminution de cette valeur de pH. À un pH supérieur à 3, Fe^{3+} commence à précipiter sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ et H_2O_2 se décompose en O_2 et H_2O . De plus, la formation des complexes ferreux à pH élevé entraîne une baisse de la concentration en Fe^{2+} . D'autre part, la régénération Fe^{2+} par la réaction de Fe^{3+} avec H_2O_2 est inhibée à pH plus acide (Zhang *et al.*, 2005; Bautista *et al.*, 2008).

La température de réaction est un autre paramètre crucial dans le processus de Fenton. En principe, l'augmentation de la température devrait améliorer la cinétique du processus. Cependant, elle favorise également la décomposition de H_2O_2 en O_2 et H_2O dont le taux augmente d'environ 2,2 fois chaque 10°C dans une gamme de $20\text{-}100^\circ\text{C}$ (Bautista *et al.*, 2008).

Il est suggéré que les trois étapes de la dégradation des matières organiques du processus de Fenton soient les suivantes: (i) la dégradation primaire dans lequel des composés d'origine subissent une transformation physico-chimique, ce qui améliore la biodégradabilité; (ii) la dégradation acceptable, ce qui signifie une prolongation de la dégradation pour diminuer de la toxicité; et (iii) la minéralisation complète en CO_2 , de l'eau et autres matières inorganiques (Zhang *et al.*, 2005). Lorsque l'oxydation Fenton est appliquée comme prétraitement, l'optimisation des paramètres d'opération est nécessaire pour améliorer la biodégradabilité des boues (oxydation partielle) et éviter l'oxydation complète de la matière organique.

1.3.3.2.2.3. L'effet de l'oxydation Fenton sur le traitement des boues

L'oxydation Fenton est efficace pour l'élimination des métaux toxiques présentés dans les boues grâce à la solubilisation de la plupart des métaux. D'abord, des oxydes métalliques sont formés par le traitement oxydatif avec des radicaux hydroxyles. Ces oxydes sont solubles et se retrouvent dans la phase aqueuse. Ensuite, certains métaux apparaissent sous forme de complexes avec des matières organiques: les complexes sont détruits par les radicaux hydroxyle alors que les ions métalliques sont libérés et peuvent être ensuite précipités, réduisant ainsi la concentration en métaux lourds résiduels (Neyens Bayens, 2003b; Andrew *et al.*, 2006).

La réaction de Fenton impliquant une décomposition par oxydation est une dépolymérisation oxydative-réductrice qui provoque le clivage de liens dans le squelette polymérique des polymères extracellulaires (Neyens *et al.*, 2004). Ainsi, l'eau liée aux boues est libérée, ce qui accroît la déshydratation des boues (Lu *et al.*, 2001; Neyens et Bayens, 2003b). Les travaux récents sur l'amélioration de la biodégradabilité des boues par l'oxydation Fenton sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 Littérature récente sur les résultats des processus de l'oxydation Fenton

Référence	Dose de H2O2	Paramètres optimaux			Temps (min)	Combinaison	Résultats
		[H ₂ O ₂] ₀ /[Fe ²⁺] ₀	pH	Température (° C)			
Erden and Filibeli, 2009	60 g /kg ST	14,9					Réduction de 28,2% en ST, 26,8% en MV, 39,6% en MES, et 46,3% en matière volatile en suspension (MVES); la production de méthane était 1,3 fois plus élevée que le contrôle au 30e jour de digestion.
Lo <i>et al.</i> , 2008	300 g/L	2,1		40 80		Micro-ondes	Concentration maximale en orthophosphate soluble de 88,1mg/L et en ammoniacque soluble de 23,8mg/L Rendement maximal d'acide gras volatil de 83mg/L
Tokumura <i>et al.</i> , 2007	4 g/L	100	3			UV	Réduction des boues de 3000 mg/L à 912 mg/L de MES.
Lopes de Morais <i>et al.</i> , 2005	2000 mg/L	200			60	UV	Amélioration de la biodégradabilité des lixivats de sites d'enfouissement en termes de DBO ₅ /DCO de 0,13 à 0,37
Neyens et Baeyens, 2003b	25 g/kg SS	15	3				Augmentation de phosphore de 3 à 4,3 mg P/L et d'azote de 104,2 à 149,6 mg N/L dans la phase de l'eau

Le principal avantage de l'oxydation Fenton est qu'elle ne requiert pas de fortes températures d'opération et que son utilisation est simple dans une station de traitement. Toutefois, l'ajout de produits chimiques (acide, peroxyde d'hydrogène) peut générer des résidus chimiques et spécialement des composés qui sont toxiques et réfractaires pour la croissance microbienne dans le traitement biologique supplémentaire.

1.3.3.2.3. Hydrolyse alcaline et thermo - alcaline

Le traitement alcalin cause une destruction de la structure des floes et de la paroi des cellules contenus dans les boues par des anions hydroxyles. Un pH élevé dénature les protéines des PEC, provoque la saponification des lipides et hydrolyse des acides ribonucléiques, ce qui conduit à la solubilisation de la membrane. Les concentrations

élevées en agents alcalins entraînent une forte dégradation. À un pH très élevé, les cellules bactériennes ne supportent pas la pression osmotique et sont brisées. Le bris des cellules libère le matériel intracellulaire de la cellule (Neyens *et al.*, 2003c; Jin *et al.*, 2009). La dégradation chimique et l'ionisation des groupes hydroxyles (-OH→-O-) induisent un gonflement des particules organiques, ce qui rend des substances cellulaires plus sensibles aux attaques enzymatiques (Neyens *et al.*, 2004; Vlyssides et Karlis, 2004). Ainsi, le traitement alcalin peut perturber des floccs et des cellules des boues, libérer des matières organiques intérieures, accélérer l'hydrolyse des boues et par conséquent, améliorer significativement la biodégradabilité de la phase solide (Li *et al.*, 2008). Le traitement alcalin des boues peut aussi libérer l'eau contenue à l'intérieur des floccs et des cellules conduisant à l'amélioration de la déshydratation des boues (Neyens *et al.*, 2003c; Li *et al.*, 2008).

L'efficacité du prétraitement des boues par l'hydrolyse alcaline peut être améliorée par l'augmentation de la température (Tanaka *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003; Vlysside et Karlis, 2004). Le temps de réaction, la température, la concentration en solides, la dose de l'agent alcalin sont des facteurs influençant la solubilisation et la biodégradabilité des boues lors de l'hydrolyse alcaline (Lin *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2008; Doğan *et al.*, 2009). Les travaux sur les prétraitements alcalin et thermo-alcalin pour l'amélioration de la biodégradation des boues sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 Travaux sur les traitements alcalin et thermo-alcalin des boues.

Référence	Paramètres optimaux				Résultats
	Agent alcalin	pH	Temps	Combinaison	
Jin <i>et al.</i> , 2009	100 g NaOH/kg SS		30	Ultrasonification (7500 kJ/kg MS d'énergie spécifique)	Augmentation de 275 mg/ L DCOS (contrôle) à 6797 mg/L; augmentation de 38,0% à 50,7% de la dégradation de la matière organique dans la digestion aérobie
Doğan and Sanin, 2009		12		micro-ondes (160 ° C)	Augmentation du ratio DCOS / DCOT de 0,005 (contrôle) à 0,34; amélioration de 16,3 % de production de gaz total et 18,9% de méthane dans le réacteur anaérobie à petite échelle; amélioration de la réduction des ST, MV, et DCOT de 24,9 %; 35,4% et 30,3% respectivement dans un réacteur anaérobie semi-continu de 2 L en 92 jours.
Verma <i>et al.</i> , 2007		10,25	45	Hydrolyse (121 ° C)	Amélioration de la biodégradabilité des boues en termes de la consommation de ST lors de la dégradation aérobie de 44,5% par rapport au contrôle de 26,5 %.
Park <i>et al.</i> , 2005	7 g NaOH/L		30	Hydrolyse (121 ° C)	Amélioration de la réduction de la DCOT de 73,7% et MV de 57%; augmentation de 0.45m ³ /kg MV de rendement en méthane et de 10,9% du contenu en méthane du biogaz issu de la digestion anaérobie.
Barnabé, 2004		10	30	Hydrolyse (140 ° C)	Une augmentation du nombre de spores produites par <i>Bacillus thuringiensis</i> de 129 %; l'entomotoxicité de 12,6x10 ³ UI/μL (augmentation de 65 % par rapport au contrôle).
Vlyssides and Karlis, 2004		11		Hydrolyse (90 ° C)	Réduction des MVES initiales de 46% et production de méthane de 0,28 L CH ₄ /kg MVES initiale
Ben Rebah <i>et al.</i> , 2001	100 mequiv.poids/L NaOH				Augmentation du rendement des cellules de <i>Sinorhizobium meliloti</i> à 21 × 10 ⁹ UFC/mL
Lin <i>et al.</i> , 1999	40meq/L NaOH				Augmentation du ratio DCOS/DCOT de 3,5 à 55%; amélioration de la réduction de la DCO de 30 % et de la production de biogaz de 34 %, récupération de 94 % du carbone et 105 % de l'azote, production en méthane de 349mL pour chaque gramme de DCO éliminé.

En dépit de l'exigence de fournir de la chaleur et du besoin de neutraliser les boues traitées, le prétraitement thermo-chimique est appliqué pour augmenter la dégradation microbienne en raison des avantages du fort degré d'hydrolyse des boues et de l'élimination des agents pathogènes et les odeurs. Cependant, le prétraitement thermo-acide est moins utilisé en raison du risque d'érosion de l'équipement.

1.3.3.3. Prétraitement biologique

Le prétraitement biologique est appliqué comme une hydrolyse pour améliorer la solubilisation et la biodégradabilité de la matière des boues pour les procédés de digestion aérobie et anaérobie. Il est aussi utilisé pour la production *in situ* des sources de carbone à partir de boues qui sont ensuite acheminées dans des procédés de traitement des eaux usées. L'hydrolyse biologique est réalisée par les enzymes sécrétées des bactéries présentes

dans des boues ou par l'ajout d'enzymes industrielles (Wawrzynczyk *et al.*, 2007; Nges et Liu, 2009).

Roman *et al.* (2006) ont étudié l'effet de l'addition d'enzymes hydrolytiques (cellulase et protéase séparément ou en combinaison) sur la digestion anaérobie des boues d'épuration primaire. Il a été constaté que le mélange des deux enzymes a conduit à une réduction de 80% des MES (comparé à 20% du contrôle) ainsi qu'à une élimination de 93% de la DCO particulaire (59% pour le contrôle) et de 97% de la DCOT (63% pour le contrôle).

Le prétraitement enzymatique a été appliquée pour l'amélioration de la déshydratation des boues en (filtrabilité et décantation) (Parmar *et al.*, 2001; Ayol, 2005). Ce traitement est basé sur la capacité des enzymes dégradant les protéines et les PEC et responsables de la déshydratation des boues. En outre, les enzymes ont aussi été utilisées pour l'extraction des polymères extracellulaires des boues activées dans un contexte de biofloculation (Sesay *et al.*, 2006).

Le prétraitement enzymatique pourrait faciliter la biodégradation des composés organiques toxiques dans le traitement biologique des boues d'épuration (Barnabé *et al.*, 2009). L'effet du prétraitement enzymatique sur l'élimination des phtalates, à savoir di-éthyl phtalate (DEP), di-butyl phtalate (DBP) et DEHP dans la digestion anaérobie a été exploré dans l'étude de Gavala *et al.* (2004). Le traitement enzymatique avec une lipase commerciale à 28°C a été très efficace, entraînant des taux de dégradation des phtalates de un à deux ordres de grandeur plus élevés que dans des conditions normales anaérobies et mésophiles.

Le temps requis pour le traitement et le coût élevé en cas d'utilisation d'enzymes industrielles sont les principales préoccupations de l'application du prétraitement biologique.

Enfin, les processus de prétraitement améliorent la biodégradabilité des boues en solubilisant certains de leurs composantes et en modifiant leurs propriétés rhéologiques. Lors de la solubilisation des boues, les amas de particules se fractionnent puis les cellules mortes et vivantes sont brisées. Cela libère des composantes cellulaires en phase liquide qui peuvent répondre aux besoins en éléments nutritifs des micro-organismes dans la biodégradation. Lors de la modification rhéologique, la viscosité et la taille des particules

des boues diminuent et les transferts d'oxygène et de masse pour la croissance de microorganismes sont améliorés. De plus, les prétraitements chimiques et biologiques hydrolysent et/ou oxydent des composants des boues en des composés plus facilement biodégradables par les micro-organismes.

1.3.4. Le comportement de phthalate de bis (2-éthylhexyle) et de ses métabolites toxiques dans des boues d'épuration

1.3.4.1. Caractéristiques générales du phthalate de bis (2-éthylhexyle)

Le DEHP est l'ester de l'acide phtalique (EAP) le plus largement utilisé pour la production de PVC et les résines de chlorure de vinyle, où il est ajouté aux plastiques pour les rendre souples. Le DEHP est une préoccupation en raison de son omniprésence dans l'environnement. Les études de l'exposition au DEHP chez les rats et outitis ont démontré que le DEHP est toxique pour la reproduction. Ces données expérimentales sur des animaux sont considérées comme pertinentes pour évaluer les risques potentiels de l'exposition du DEHP chez les humains (Kavlock *et al.*, 2006). Le DEHP est considéré comme un perturbateur endocrinien par l'organisme CPE et classé dans le groupe B2 (probablement cancérigène pour l'homme) par l'organisme US EPA.

Le DEHP est un ester de l'acide phtalique (CAS 117-81-7) avec un poids moléculaire est 390,6. Sa formule moléculaire est $C_{24}H_{38}O_4$. Il est aussi connu sous d'autres appellations dont ester de bis(2-éthylhexyle), phtalate d'éthyle-2-hexyle, dioctylphtalate (DOP). Le phtalate de bis(2-éthylhexyle) est un liquide huileux incolore dont la pression de vapeur de $6,2 \times 10^{-8}$ mm Hg à 25°C. Sa constante de la loi de Henry est de $3,0 \times 10$ Pa m /mol. L'intervalle des valeurs du logarithme du coefficient de partage octanol/eau ($\log K_{ow}$) varie entre 4,2 to 5,11 alors que sa solubilité dans l'eau varie entre 270 et 400 $\mu\text{g/L}$ à 25°C (Liste des substances d'intérêt prioritaire, U.S. EPA, 2000)

1.3.4.2. Voie de dégradation de DEHP entraînant la formation de métabolites toxiques

Comme d'autres esters de phtalate, le DEHP se transforme dans l'environnement par hydrolyse, photodégradation et biodégradation. L'hydrolyse des esters de phtalates subit deux étapes : la première étape est la production d'un mono-ester et d'un alcool et la deuxième résulte en un acide phtalique et un second alcool. La photolyse en milieu aqueux des esters de phtalates se fait par absorption de la lumière UV du soleil dans la région de 290-400 nm. Toutefois, la dégradation abiotique des esters de phtalates se fait lentement.

La biodégradation a un impact plus important sur le comportement des esters de phtalate dans l'environnement (Staples *et al.*, 1997). Les phtalates sont biodégradés sous des conditions aérobies et dans certains milieux anaérobies par des bactéries et des actinomycètes en consortium ou individuellement. Une des voies métaboliques pour la dégradation du DEHP dans des conditions aérobies commence est présentée à la Figure 2. Trois métabolites doivent être surveillés. Il y a le 2-éthylhexanol qui est un produit de la réaction d'hydrolyse). Il y a aussi le 2-éthylhexanal qui résulte de l'oxydation du 2-éthylhexanol et finalement l'acide 2-éthylhexanoïque (Horn *et al.*, 2004). Ces trois métabolites ont une toxicité aiguë envers les animaux. De plus, l'acide 2-éthylhexanoïque est un composé récalcitrant. Une attention particulière doit être portée aux sous-produits de la biodégradation du DEHP car ils sont aussi répandus dans l'environnement que leur composé parent (Nalli *et al.*, 2006a).

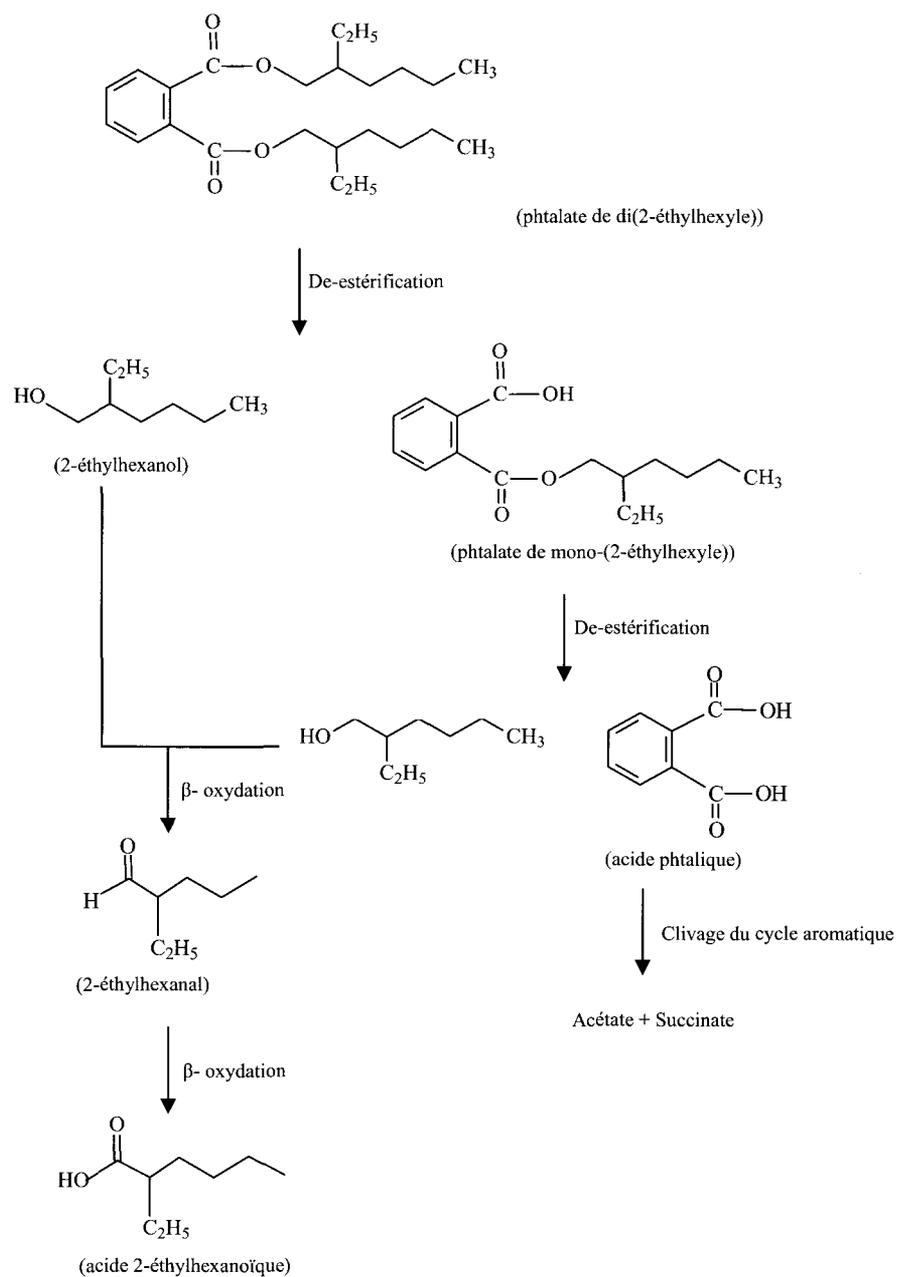


Figure 2 Voie proposée de la biodegradation du phtalate de di(2-éthylhexyle) (Staples, 1997; Horn et al. (2004); Amir et al. (2005))

1.3.4.3. Prétraitement pour l'amélioration de la biodégradabilité des boues et l'élimination simultanée des phtalates

Le prétraitement appliqué pour améliorer la bioconversion des boues peut être efficace sur l'élimination et la détoxification des composés toxiques dans des boues (Barnabé et al, 2009). Le traitement thermo-alcalin, l'ozonation, l'oxydation Fenton, les ultrasons et le traitement enzymatique appliqués avant la biodégradation des boues peuvent éliminer ou détoxifier des CPE (Kitis *et al.*, 1999; Gavala *et al.*, 2004; Carballa *et al.*, 2007 ; Bernal-Martinez *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007). Toutefois, il existe seulement quelques études sur l'élimination du phtalate par le prétraitement avant la biodégradation des boues. Gavala *et al.* (2004) ont étudié l'effet du prétraitement thermique des boues à 70°C sur la dégradation du DEHP et autres phtalates. Les chercheurs ont observé que les phtalates sont lentement dégradés au cours du prétraitement thermique par des réactions physico-chimiques plutôt que par l'activité microbienne. Toutefois, le prétraitement thermique a affecté la biodégradabilité anaérobie des esters de phtalates. D'autre part, le traitement enzymatique par une lipase commerciale s'est avéré très efficace pour l'enlèvement des EAP. La dégradation enzymatique des phtalates est de un à deux ordres de grandeur plus rapide que dans des conditions normales anaérobies mésophiles. Chang *et al.* (2007) ont déterminé qu'une durée de l'ultrasonification de 20 min avec une puissance de 0,1 W/mL sont des conditions optimales de prétraitement ultrasonique pour la dégradation aérobie des EAP. Des niveaux de puissance supérieure aux durées différentes de l'ultrasonification ont entraîné une baisse de la vitesse de la dégradation en raison de la réduction de l'activité bactérienne.

En fait, les méthodes de prétraitement provoquent des changements des caractéristiques physico-chimiques des boues et améliorent ainsi la biodisponibilité de composés organiques (voir sections précédentes). Également, le prétraitement dégrade des composés toxiques et réfractaires et les convertit en molécules facilement biodégradables. Par conséquent, le DEHP des boues peut être transformé et devenir plus biodisponible lors d'un traitement biologique subséquent. Les ultrasons et les procédés d'oxydation avancée, ont été appliquées pour la dégradation du DEHP lors du traitement de l'eau potable et des eaux usées (Psillakis *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2009; Askura et Matsuto, 2009). Pour ces raisons, il est possible que l'application des procédés de prétraitement avant la

bioconversion des boues pour la production à valeur ajoutée soit efficace sur la détoxification et l'élimination du DEHP.

1.3.4.4. Biodégradation du DEHP durant le traitement des boues d'épuration

Comme la solubilité dans l'eau du DEHP est très faible (270 à 400 mg/L à 25°C) et le coefficient de partage octanol/eau ($\log K_{ow}$) est élevée (4,2 à 5,11), le DEHP a un fort potentiel de sorption aux matières solides des eaux usées (Langford et Lester, 2003). La faible pression de vapeur du DEHP ($6,2 \times 10^{-8}$ mm Hg à 25°C) indique qu'il se volatilise très peu pendant l'aération des eaux usées. La dégradation abiotique du phtalate est donc négligeable dans les stations de traitement des eaux usées. Par conséquent, il y a une forte concentration du DEHP dans les boues, spécialement dans les cas où il n'y a pas de traitement biologique (Langford et Lester, 2003).

1.3.4.4.1. L'enlèvement du DEHP lors du traitement des eaux usées

En étudiant l'enlèvement du DEHP lors de différentes étapes dans une station de traitement des eaux usées, Marttinen *et al.*, 2003 a constaté que la réduction importante de la concentration du DEHP dans la phase liquide est principalement due à la sorption du DEHP aux boues primaires et secondaires (ayant une teneur élevée en matière organique). Cette conclusion a été en accord avec les études de Barnabé *et al.* (2008) où une forte concentration a été observée dans les boues homogénéisées et filtrées dans l'usine de traitement physico-chimique des eaux usées de Montréal. Le DEHP est significativement éliminé lors du traitement des eaux usées par biofilms et par boues activées (Oliver *et al.*, 2007; Roslev *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008). Le procédé des boues activées est efficace pour l'élimination du DEHP. De forts pourcentages de DEHP enlevés et de faibles pourcentages de DEHP persistants dans des boues ont été observés dans les études de Roslev *et al.* (2007) et Huang *et al.* (2008). La disponibilité de l'oxygène influence la dégradation microbienne du DEHP, tandis que la présence de substrats compétitifs (y compris des lipides qui contiennent des liaisons ester) et le vieillissement des boues peuvent atténuer la dégradation. Les biofilms microbiens dans les systèmes de biofiltration sont efficaces pour l'enlèvement du DEHP par des microcosmes fonctionnant en mode de recirculation selon les études d'Olivier (2007). L'auteur a démontré que cette réduction était attribuée à la fois à l'adsorption et à la biodégradation dans le système de biofilm. La biodégradation du DEHP a donc été moins importante que l'adsorption physique par la biomasse microbienne dans les biofilms.

1.3.4.4.2. L'enlèvement du DEHP lors du compostage des boues

L'efficacité du compostage pour réduire le DEHP contenu dans les boues a été étudié par plusieurs auteurs (Marttinen *et al.*, 2004; Amir *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008; Pakou *et al.*, 2009). Au cours de compostage des boues, des polluants organiques sont biodégradés par l'activité des microorganismes, conduisant ainsi à la stabilisation des matières organiques présentes dans les boues. Une longue période de compostage peut réduire de plus de 50% la concentration en DEHP. Cette réduction montre une bonne corrélation avec la réduction de la matière organique telle que reportée dans les études mentionnées précédemment. Dans le compostage aérobie, la dégradation du DEHP par des microorganismes est considérée comme l'une des principales voies de dégradation (Amir *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2008). Amir *et al.* (2005) a proposé deux voies cataboliques du DEHP, soit la de-alkylation et la de-estérification. La première voie conduit à l'accumulation des phtalates à courtes chaînes latérales alkyles telles que le phtalate dibutyle et le phtalate diméthyle. La seconde voie conduit à la production de monoesters MEHP qui sont ensuite métabolisés en acide phtalique. Une forte concentration en DEHP a un effet d'inhibition sur la décomposition microbienne (Amir *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2008; Pakou *et al.*, 2009). Bien qu'une forte teneur en DEHP dans des boues soit dégradée lors du compostage, une partie du DEHP peut aussi se lier aux particules et une autre partie peut avoir été séquestrée dans des microsites inaccessibles dans le compost (durant le processus de vieillissement) (Marttinen *et al.*, 2004). Ainsi, la présence de DEHP résiduel doit être envisagé lorsque le compost est appliqué sur des terres agricoles.

1.3.4.4.3. L'enlèvement du DEHP par la digestion des boues

Plusieurs études ont été menées pour évaluer la biodégradation du DEHP suite à la digestion aérobie des boues (Banat *et al.*, 1999; Marttinen *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007). Un pourcentage élevé de l'élimination du DEHP (> 60%) est obtenu lors de la stabilisation aérobie des boues comme indiquées dans les études de Banat *et al.* (1999) et Marttinen *et al.* (2004). En outre, Banat *et al.* (1999) a montré que des températures élevées dans des conditions thermophiles d'aération ont des effets positifs sur la réduction du DEHP ainsi que sur la réduction de la matière organique des boues. De plus, Chang *et al.* (2007) ont démontré que la dégradation aérobie des phtalates est augmentée par un prétraitement ultrasonique car ce traitement augmente l'activité des microorganismes dans les boues lors de la digestion aérobie.

La biodégradation du DEHP dans la digestion anaérobie des boues a été abordée dans de nombreuses études (Alatriste-Mondragon *et al.*, 2003; Gavala *et al.*, 2004; Fountoulakis *et al.*, 2006, El-Hadj *et al.*, 2006). À de faibles concentrations en DEHP, la dégradation du phtalate se fait lentement lors de la digestion anaérobie comme indiqué dans les études mentionnées précédemment. Toutefois, la forte concentration en DEHP a eu un effet négatif sur l'élimination des phtalates et la production de gaz à l'étape de la méthanogénèse. Cela est dû à l'accumulation du DEHP (> 60 mg / L) qui devient toxique pour la digestion (Alatriste-Mondragon *et al.*, 2003; Gavala *et al.*, 2004). De plus, il a été émis comme hypothèse que le 2-éthylhexanol, un métabolite de la biodégradation du DEHP, a eu un effet sur la membrane des cellules microbiennes causant l'inhibition. Il a été montré dans les travaux de Fountoulakis *et al.* (2006) que le facteur limitant pour la biodégradation du DEHP est le processus de sorption - désorption dans la fraction solide en raison de son hydrophobicité élevée. Le DEHP dissous dans la phase aqueuse et adsorbé sur la surface des matières sont assimilables par les microorganismes ou leurs enzymes. Ainsi, le taux de dégradation du DEHP est proportionnel à cette concentration biodisponible du DEHP. De plus, la température élevée des conditions thermophiles et le temps de rétention accroissent l'élimination du DEHP lors de la digestion anaérobie (El-Hadj *et al.*, 2006).

1.3.4.4.4. L'enlèvement du DEHP par des microorganismes

Des souches pures microbiennes, isolées des boues, ont la capacité d'utiliser le DEHP comme des sources uniques de carbone et d'énergie (Chang *et al.*, 2007; Roslev *et al.*, 2007). Il a été constaté dans les études sur la biodégradation du DEHP lors le processus des boues activées de Roslev *et al.* (2007) que l'ensemencement des échantillons des boues par une bactérie dégradante DEHP accroît la dégradation initiale du DEHP. La bactérie appartient au genre *Rhodococcus* spp. Dans les travaux de Chang *et al.* (2007), des souches microbiennes isolées de boues secondaires ont démontré la capacité de dégrader le DEHP et appartiennent aux genres *Enterococcus* sp., *Bacillus benzoovorans*, *Sphigomonas* sp. et *Corynebacterium* sp.. Quan *et al.* (2006) a démontré que *Bacillus subtilis*, isolé du sol, peut dégrader une forte concentration en DEHP dans des sols contaminés aux phtalates.

Certaines espèces de *Bacillus* ont été utilisées pour la production des PVA de boues tels que des toxines insecticides de *B. thuringiensis* pour la lutte biologique et des protéases alcalines de *B. licheniformis* pour les processus de bioblanchiment (Barnabé *et al.*, 2009).

Il a été reporté que des espèces du genre *Bacillus sp.* puissent produire des enzymes telles que des déshydrogénases et des peroxydases capables de dégrader du DEHP (Barnabé *et al.*, 2009). Ainsi, la production des PVA de boues utilisant des souches industrielles de *Bacillus sp.* a le potentiel de dégrader le DEHP et obtenir des PVA sans phtalate.

1.4. Hypothèses – Objectifs – Originalité

1.4.1. Hypothèses de recherche

Selon les problématiques spécifiques de cette étude et en tenant compte de la revue de littérature, les hypothèses de recherche suivantes ont été formulées:

- L'ultrasonification, l'hydrolyse thermique et thermo-alcaline ainsi que les procédés d'oxydation avancée améliorent la biodégradabilité des boues par la lyse des cellules, la désintégration des floes et la solubilisation de la matière organique des boues. La haute disponibilité de la matière organique des boues prétraitées accélère le degré de dégradation des matières organiques dans les procédés aérobie et anaérobies.
- En ce qui concerne l'utilisation des boues d'épuration comme matière première pour la production de biopesticides à base de *Bacillus thuringensis* (Bt), Barnabé (2004), Yezza *et al.* (2005), Verma *et al.* (2005), Brar *et al.* (2005) ont montré que l'application de l'hydrolyse thermique, l'hydrolyse thermo alcaline et l'oxydation partielle pour prétraiter des boues d'épuration augmente la croissance microbienne (Bt) et accroît la production de PVA.

Hypothèse 1: Les processus de prétraitement, soit l'ultrasonification comme processus physique et l'oxydation Fenton comme processus chimique améliorent la production de biopesticides à base de Bt dans des boues d'épuration.

- La nature non polaire et hydrophobe de certains composés organiques toxiques les amènent à s'adsorber sur des particules. Par conséquent, une grande quantité de ces composés se retrouvera dans les boues. Parmi les composés toxiques organiques dans les boues d'épuration, le DEHP est considéré comme ayant un niveau élevé de toxicité en raison de sa structure complexe (longue chaîne alkyle) pour la biodégradation, sa dégradation potentielle en métabolites toxiques et son abondance dans les boues.
- Lors de la bioconversion des boues d'épuration, il y a des micro-organismes indigènes et isolés qui peuvent dégrader les phtalates grâce à leurs systèmes enzymatiques. Si les procédés de prétraitement mentionnés à l'hypothèse 1 peuvent

modifier les boues d'épuration pour augmenter leur biodégradabilité pour la stabilisation et la production des produits à valeur ajoutée, cela suggère que la dégradation des phtalates lors de la stabilisation des boues et la production de produits à valeur ajoutée à partir des boues sera améliorée. Toutefois, il est possible qu'à côté de la capacité de dégrader les polluants organiques totalement, les micro-organismes puissent partiellement les dégrader en des intermédiaires plus ou moins toxiques.

Hypothèse 2 : Le phtalate de di-(2-éthylhexyle) est dégradé partiellement en intermédiaires toxiques lors des procédés de prétraitement mentionnés à l'hypothèse 1 et lors de la bioconversion en produits à valeur ajoutée.

1.4.2. Objectifs de recherche

L'objectif principal de ce travail est d'étudier l'effet des processus de prétraitement mécanique et chimique des boues d'épuration sur l'amélioration de la bioconversion en produits à valeur ajoutée et l'enlèvement simultané des polluants organiques, en l'occurrence le DEHP.

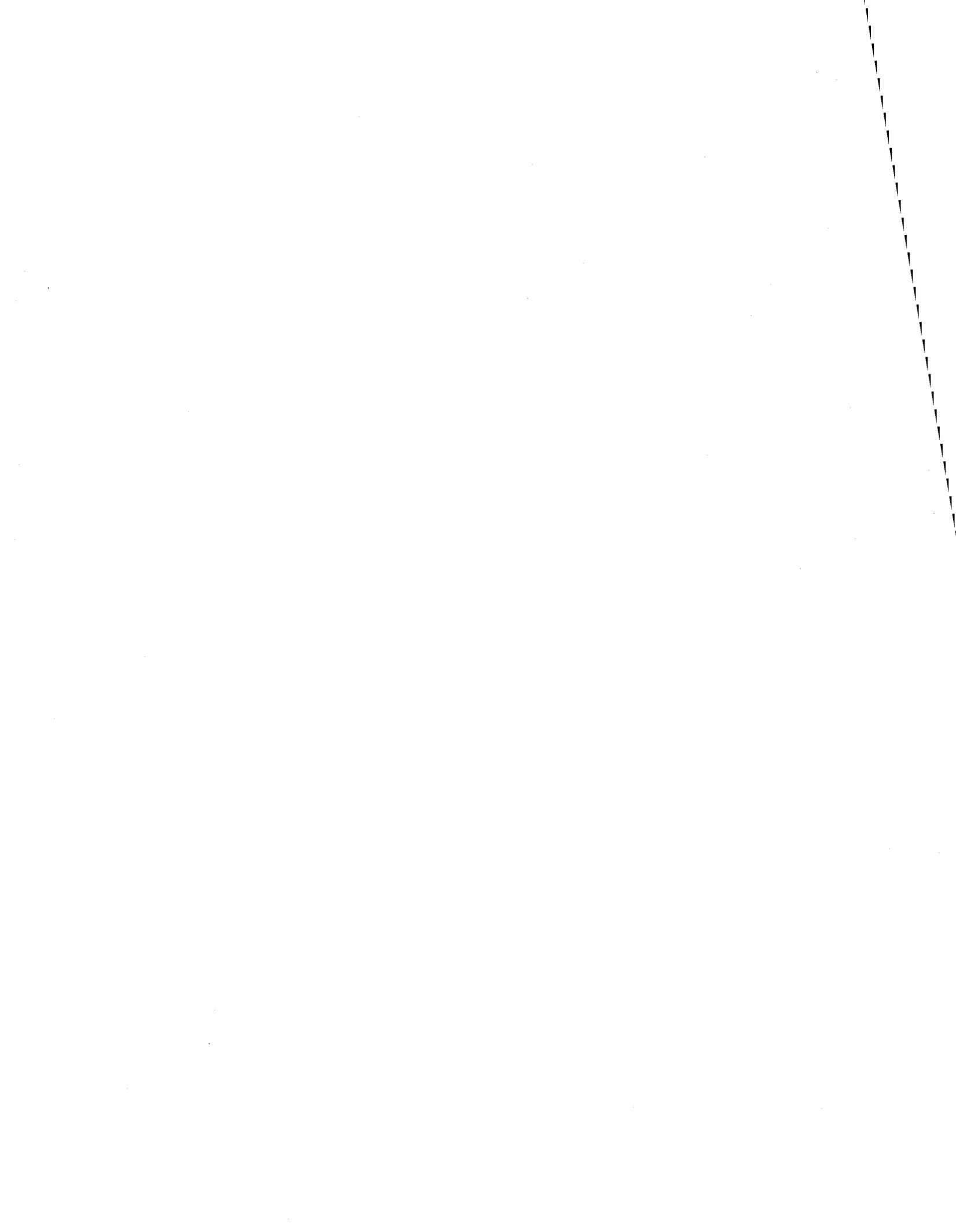
Basés sur les hypothèses mentionnées ci-dessus, les objectifs spécifiques du travail sont les suivants :

1. Étudier et optimiser les paramètres du prétraitement de l'ultrasonification des boues d'épuration, c'est-à-dire l'amplitude, le temps d'ultrasonification et la concentration en solides des boues.
2. Étudier et optimiser les paramètres du prétraitement de l'oxydation Fenton des boues d'épuration, c'est-à-dire la concentration de peroxyde d'hydrogène, le ratio de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène et la concentration initiale du fer, le temps de réaction, la température de réaction, et la concentration en solides des boues.
3. Étudier l'effet de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton sur la croissance de *Bacillus thuringensis* dans les boues.
4. Étudier l'effet de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton sur la rhéologie des boues.
5. Étudier l'effet de l'ultrasonification et l'oxydation Fenton sur la biodégradation du phtalate de di-(2-éthylhexyle) dans les boues

1.4.3. Originalité de la recherche

L'INRS-ETE développe des bioprocédés novateurs qui utilisent les boues d'épuration comme matière première pour l'obtention de produits à haute valeur ajoutée, c'est-à-dire des bio-insecticides, des agents de biocontrôle, des inoculants microbiens et des enzymes industrielles. Toutefois, afin de maximiser le rendement des bioprocédés de production à valeur ajoutée, le potentiel nutritif des boues d'épuration pour la croissance des micro-organismes est l'un des facteurs les plus importants. De plus, pour les futures applications des produits à valeur ajoutée fabriqués à partir de boues, l'enlèvement et/ou la détoxification des polluants organiques présents dans les boues doivent être pris en compte.

La principale originalité de ce travail est l'augmentation de la biodégradabilité des boues d'épuration concomitante avec l'enlèvement du phtalate de di-(2-éthylhexyle), en tenant compte de la génération potentielle des métabolites toxiques au cours du prétraitement et de la bioconversion en produits à haute valeur ajoutée.



1.5. Démarche méthodologie

1.5.1. Plan expérimental

Le plan expérimental de cette étude est présenté dans la figure suivante (Figure 3):

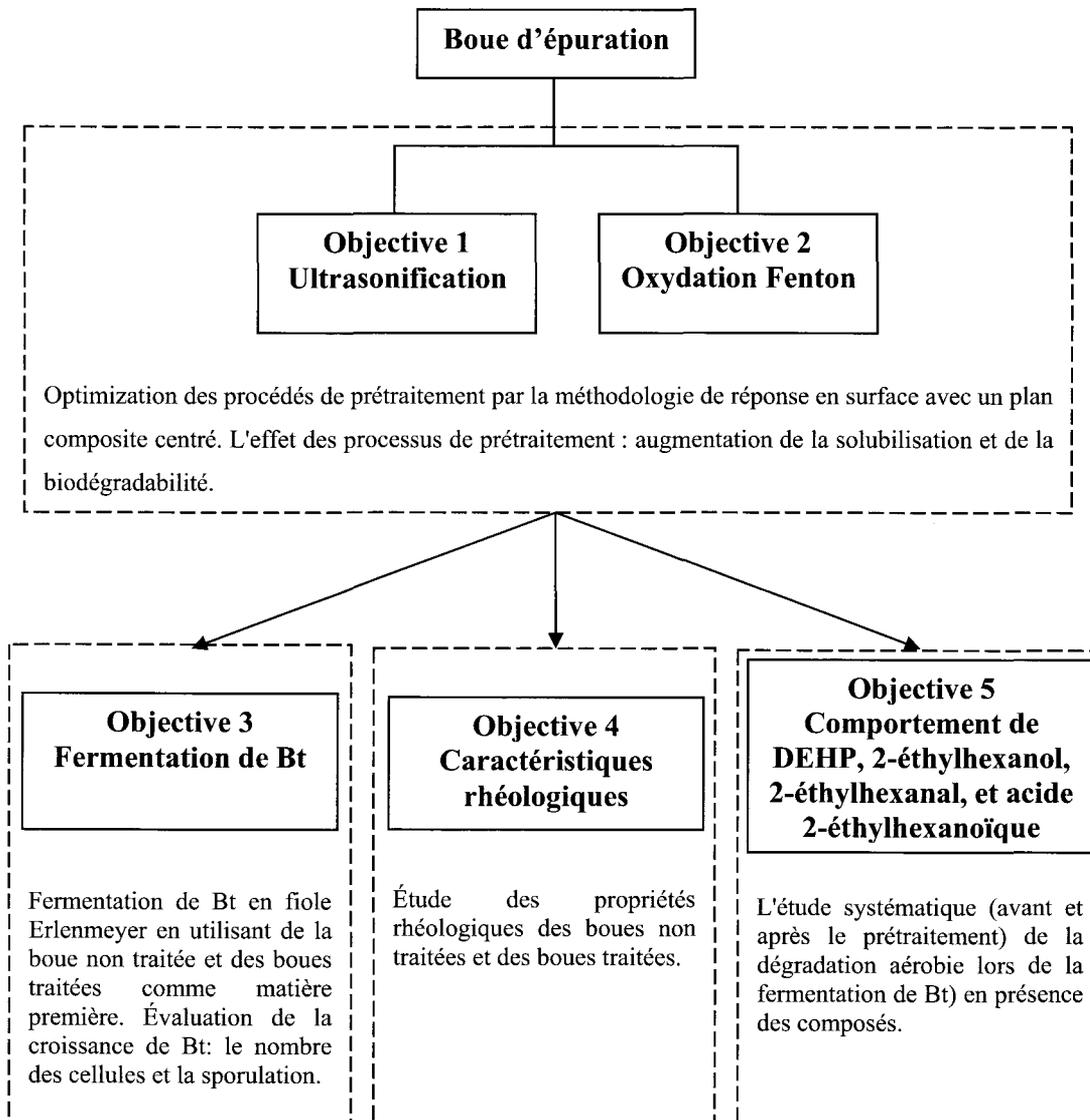


Figure 3 Scématic récapitulatif du plan expérimental

1.5.2. Démarche méthodologie

La méthodologie pour chacun des objectifs spécifiques est présentée dans les chapitres relatifs à ces objectifs. Le chapitre 2 porte sur les travaux de l'optimisation des processus de prétraitement des boues (Objectifs 1, 2, 3). Le chapitre 3 concerne les travaux sur les effets du prétraitement vis-à-vis la rhéologie des boues (Objectif 4). Le chapitre 4 présente les travaux sur les effets du prétraitement sur la biodegradation du phtalate di(2-éthylhexyle).

1.6. Résultats

1.6.1. *L'optimisation de l'ultrasonification des boues d'épuration*

Le prétraitement des boues d'épuration par des ultrasons à une fréquence de 20 kHz a été réalisé en utilisant un homogénéisateur ultrasonique Autotune 750W (Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, IL,US). Différentes concentrations en ST des boues d'épuration, des intensités ultrasoniques et des temps d'exposition ont été étudiées pour l'optimisation. Les paramètres optimaux provisoires ont été déterminés par des expériences préliminaires (« screening experiments »). Les paramètres ont ensuite été optimisés avec un plan composite centré et la méthodologie de réponse en surface. L'effet de l'ultrasonification a été évalué par les augmentations de la solubilisation (en termes de DCOS) et de la biodégradabilité (en terme de consommation de solides totaux-ST dans la digestion aérobie) des boues d'épuration. Il a été observé que l'intensité ultrasonique et la durée d'exposition ont eu un impact important sur l'efficacité du processus d'ultrasons suivi de la concentration en solides. Les conditions optimales du prétraitement par l'ultrasonification sont les suivantes : 0,75 W/cm² d'intensité ultrasonique, 60 min de temps d'exposition et 23 g/ L de ST. Dans ces conditions, la solubilisation et la biodégradabilité sont de 45,5 % et 56 %, respectivement. Les résultats sont discutés plus en détails dans l'article.

1.6.2. *L'optimisation de l'oxydation Fenton des boues d'épuration*

L'optimisation de l'oxydation Fenton a été effectuée avec cinq paramètres, soit la concentration en peroxyde d'hydrogène (volume de H₂O₂ par g de MES), le rapport de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène et de la concentration initiale de métaux ferreux, le temps de réaction, la température de réaction et la concentration en ST des boues. L'effet de l'oxydation Fenton a été évalué par les augmentations de la solubilisation et de la biodégradabilité des boues d'épuration. Les paramètres optimaux provisoires ont été déterminés par des expériences préliminaires. Les paramètres du prétraitement ont été optimisés avec un plan composite centré et la méthodologie de réponse en surface. La plus forte solubilisation observée était de 81% à des conditions de 0,01 mLH₂O₂/gMES, 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L ST, à 70°C et en 120 min. La plus haute biodégradabilité obtenue était de 74%. Elle a été obtenue dans des conditions similaires pour la concentration de H₂O₂, le rapport de [H₂O₂]₀-à-[Fe²⁺]₀, et la concentration en ST, mais à

plus basse température (25°C) et sur une plus courte durée (60 min) par rapport aux conditions optimales de la solubilisation. Les résultats sont discutés plus en détails dans l'article.

1.6.3. Effet de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton sur la fermentation des boues d'épuration par *Bacillus thuringensis*

Des fermentations de Bt en fiole Erlenmeyer en utilisant des boues non traitée et des boues traitées par ultrasonification et l'oxydation Fenton comme substrat ont été effectuées. Les boues ont été traitées aux conditions optimales de l'ultrasonification, soit 0,75 W/cm² d'intensité ultrasonique, 60 min de temps d'exposition, et 23 g/L de ST et de l'oxydation Fenton, soit de 0,01 mLH₂O₂/g MES, 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L ST, à 25°C et en 60 min. L'amélioration de la production des PVA par le prétraitement a été déterminée en évaluant la croissance de Bt, c'est-à-dire le nombre des cellules et la sporulation. Le nombre maximum de cellules totales, observées après 30 h de fermentation, étaient de 1,44 x 10⁸ UFCmL⁻¹, 4,08 x 10⁸ UFC mL⁻¹, et 1,63 x 10⁹ UFC mL⁻¹ pour RS, UIS et FS, respectivement. La formation de spores dans RS et FS a commencé à 9 h de la fermentation alors que la sporulation dans UIS a commencé plus tard à 15 h de la fermentation. À 48 h de fermentation, 96% des cellules de Bt dans FS ont sporulé, tandis que dans UIS et RS, il y avait seulement 90% et 84% de la sporulation, respectivement. De plus, la plus haute valeur du taux de croissance spécifique maximale de Bt a été atteinte pour FS (0,41 h⁻¹), suivie par UIS (0,33 h⁻¹) et RS (0,32 h⁻¹). Ainsi, l'oxydation classique Fenton (traitement chimique) s'avère très prometteur pour la production de biopesticides de Bt à partir de boues d'épuration par rapport à l'ultrasonification (traitement physique). Les résultats sont discutés plus en détails dans l'article.

1.6.4. Effet de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton sur les propriétés rhéologiques des boues d'épuration

Les propriétés rhéologiques de la boue non traitée et des boues traitées par l'ultrasonification et l'oxydation Fenton ont été étudiées à l'aide d'un viscosimètre rotatoire Brookefield DVII PRO + équipé d'un logiciel Rheocalc32. Les boues ont été traitées dans des conditions optimales de l'ultrasonification et l'oxydation Fenton. Les boues non traitées et traitées avaient un comportement non newtonien et rhéofluidifiant ainsi que des propriétés thixotropiques pour les concentrations en ST allant de 10 g/L à 40 g/L. Les modèles rhéologiques, soit ceux de Plastique Bingham, Casson, NCA/CMA Casson,

Pâte IPC, et Loi de Puissance ont également été étudiés pour caractériser l'écoulement des boues. Parmi les modèles rhéologiques, Loi de Puissance était le plus important pour caractériser la rhéologie des boues. Les prétraitements ont entraîné une diminution de la pseudoplasticité des boues en raison de la baisse de l'indice de consistance K variant de 42,4 à 1188, de 25,6 à 620,4 et 52,5 à 317,9. Ils ont entraîné aussi une augmentation de l'indice de comportement de l'écoulement n changeant de 0,5 à 0,35, de 0,62 à 0,55 et de 0,63 à 0,58, pour RS, UIS et FS, respectivement aux concentrations en ST de 10 - 40 g/L. L'amélioration de la décantation, de la diminution de la viscosité et du changement de la taille des particules en fonction des processus de prétraitement des boues a également été étudiée. L'oxydation Fenton a facilité la filtrabilité des boues, résultant en une valeur du temps de succion capillaire de 50% pour les boues non traitées. Dans le cas de l'ultrasonification, l'énergie d'entrée élevée a détérioré la filtrabilité. Le prétraitement a entraîné une diminution de la viscosité: la viscosité apparente a diminué, passant de 2,89 - 359,7 pour RS à 2,51 - 199,2 et 2,68 - 108,3 mPa s pour UIS et FS, respectivement, à des concentrations en ST de 10-40 g/L. L'ultrasonification a entraîné une plus grande diminution de la taille des particules. Au contraire, l'oxydation Fenton a augmenté la taille des particules. Parmi RS, UIS et FS, le pourcentage de volume de particules de petite taille (inférieure à 10 μm) a été le plus élevé (0,54% - 0,38%) pour UIS à une concentration en ST de 10 - 40 g/L alors que le volume occupé par les grosses particules (supérieures à 250 μm) a été la plus prononcée pour FS (0,89 - 5,62%) à une concentration en matière totale de 10 - 40 g/L. Le prétraitement a modifié les propriétés rhéologiques des boues d'épuration, ce qui a amélioré l'assimilation des nutriments par les microorganismes pour la valorisation des boues. Les résultats sont discutés plus en détails dans l'article.

1.6.5. Effet de l'ultrasonification et l'oxydation Fenton sur la biodégradation du DEHP

L'étude systématique (avant et après le prétraitement, la dégradation aérobie et la fermentation de *Bt*) de la présence du DEHP et de ses métabolites, à savoir les 2-éthylhexanol, 2-éthylhexanal, et acide 2-éthylhexanoïque, dans les boues d'épuration a été effectuée. Le DEHP et l'acide 2-éthylhexanoïque ont été observés à des concentrations importantes. Quant à eux, les 2-éthylhexanol et 2-éthylhexanal ont été observés à de faibles concentrations dans des boues non traitées et traitées par l'ultrasonification et l'oxydation Fenton. Pour la dégradation aérobie, les microorganismes indigènes présents dans les boues ont été responsables de la biodégradation du DEHP, résultant en des enlèvements en masse du DEHP de 72%, 89% et 85%, et de l'acide 2-éthylhexanoïque de 71%, 84%, 79%,

respectivement pour RS, UIS et FS. Les travaux ont permis de faire une découverte très intéressante : Bt est en mesure de dégrader le DEHP, résultant en l'enlèvement en masse de ce polluant de 21%, 40% et 30% pour RS, UIS et FS après la fermentation. L'ultrasonication et l'oxydation Fenton ont amélioré la biodégradabilité des boues d'épuration et la biodisponibilité des composés organiques cibles pour la digestion et la fermentation. Les résultats sont discutés plus en détails dans l'article.

RÉFÉRENCES

- Abad E., Martinez K., Planas C., Palacios O., Caixach J., Rivera J. (2005). Priority organic pollutant assessment of sludges for agricultural purposes. *Chemosphere* 61:1358-69.
- Ahn J.-H., Shin S. G., Hwang S. (2009). Effect of microwave irradiation on the disintegration and acidogenesis of municipal secondary sludge. *Chemical Engineering Journal* 153: 145-150.
- Alatrisme-Mondragona F., Iranpourb R., Ahring B. K. (2003). Toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate on the anaerobic digestion of wastewater sludge. *Water Research* 37: 1260-1269.
- Alvarenga P., Palma P., Gonçalves A.P., Fernandes R.M., Cunha-Queda A.C., Duarte E., Vallini G. (2007). Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environment International* 33: 505–513.
- Amir S., Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Jouraiphy A., El Gharous M., Revel J.C. (2005). Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges. *Process Biochemistry* 40: 2183-2190.
- Andrews J.P., Asaadi M., Clarke B., Ouki S., (2006). Potentially toxic element release by Fenton oxidation of sewage sludge. *Water Sci. Technol.* 54 (5): 197-205.
- APHA, AWWA and WEF (2005), Standard methods for the examination of water and. Wastewater, 21st Edition
- Aquino S. F., Chernicharo C. A. L., Soares H., Takemoto S. Y., Vazoller R. F. (2008). Methodologies for determining the bioavailability and biodegradability of sludges. *Environmental Technology* 29: 855-862.
- Asakura H., Matsuto T. (2009). Experimental study of behavior of endocrine-disrupting chemicals in leachate treatment process and evaluation of removal efficiency. *Waste Management* 29: 1852-1859.
- Assessment report on 2-ethylhexanol for developing ambient air quality objectives-Alberta Environment
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C.D., Surampalli R.Y. (2006). Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry* 41(3): 525-39.
- Ayol A. (2005). Enzymatic treatment effects on dewaterability of anaerobically digested biosolids-I: performance evaluations. *Process Biochemistry* 40: 2427-2434.
- Banat F. A., Prechtl S., Bischol F. (1999). Experimental assessment of bio-reduction of di 2-ethylhexyl phthalate (DEHP) under aerobic thermophilic conditions. *Chemosphere* 39 (12): 2097-2106.
- Barnabé S. (2004). Hydrolyse et oxidation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire *Bacillus thuringiensis* HD-1. PhD Thesis, Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, Université du Québec.
- Barnabé S., Beauchesne I., Copper D.G., Nicell J.A. (2008). Plasticizers and their degradation products in the process streams of a large urban physicochemical sewage treatment plant. *Water Research* 42: 153-162.
- Barnabé S., Brar S.K., Tyagi R.D., Beauchesne I., Surampalli R.Y. (2009). Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products - Fate of endocrine disrupting compounds. *Science of the Total Environment* 407: 1471-1488.

- Bautista P., Mohedano A. F., Casas J. A., Zazo J. A., Rodriguez J. J. (2008). An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. *J Chem Technol Biotechnol* 83: 1323-1338.
- Ben Rebah F. B., Tyagi R. D., Prévost D. (2001). Acid and alkaline treatments for enhancing the growth of rhizobia in sludge. *Can. J. Microbiol.* 47: 467-474.
- Ben Rebah F., Prévost D., Yezza A., R.D. Tyagi (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology* 98: 3535–3546.
- Bernal-Martinez A., Carrère H., Patureau D., Delgenès J.-P. (2007). Ozone pre-treatment as improver of PAH removal during anaerobic digestion of urban sludge. *Chemosphere* 68: 1013-1019.
- Birkett J.W., Lester J.N. (2003). Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. London: CRC Press LLC and IWA publishing; United Kingdom, 295 pp.
- Bis(2-ethylhexyl)phthalate - Priority substances list assessment report - Canadian environmental protection act. Minister of Supply and Services Canada 1994.
- Bourgrier C., Albasi C., Delgenès J.P., Carrère H. (2006). Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering and Processing* 45: 711–718.
- Bourgrier C., Delgenès J.P., Carrère H. (2007). Impacts of thermal pre-treatments on the semi-continuous anaerobic digestion of waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* 34: 20-27.
- Bourgrier C., Carrère H. and Delgenès J.P. (2005). Solubilization of waste-activated sludge by ultrasonic treatment. *Chemical Engineering Journal* 106: 163-169.
- Brar S. K., Verma M., Tyagi R. D., Valéro J. R., and Surampalli R. Y. (2005). “Sludge based *Bacillus thuringiensis* biopesticides: Viscosity impacts”. *Water Research* 39: 3001 -3011.
- Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. (2007). *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge - rheology and formulation studies. *Chemosphere* 67: 674-83.
- Cacho Rivero J. A. and Suidan M. T. (2006). Effect of H₂O₂ dose on the thermo-oxidative co-treatment with anaerobic digestion of excess municipal sludge. *Water Sci. Technol.* 54 (2): 253-259.
- Carballa M., Manterola G., Larrea L., Ternes T., Omil F., Lema J. M. (2007). Influence of ozone pre-treatment on sludge anaerobic digestion: Removal of pharmaceutical and personal care products. *Chemosphere* 67: 1444-1452.
- CEC. Working document on sludge—3rd draft. Commission of the European Communities Directorate-General Environment, ENV.E.3/LM, Brussels, 27 April 2000.
- Chang B.V., Wang T.H., and Yuan S.Y. (2007). Biodegradation of four phthalate esters in sludge. *Chemosphere* 69: 1116-1123.
- Chen C., Wu P., Chung Y.-C. (2009). Coupled biological and photo-Fenton pretreatment system for the removal of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from water. *Bioresource Technology* 100: 4531-4534.
- Chen Y., Jiang S., Yuan H., Zhou Q., Gu G. (2007). Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research* 41: 683-689.
- Cheng H.-F., Kumar M., Lin J.-G (2008). Degradation kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and organic matter of sewage sludge during composting. *Journal of Hazardous Materials* 154: 55-62.
- Chu C. P., Chang Bea-Ven, Liao G.S., Jean D. S., Lee D. J. (2001). Observations on changes in ultrasonically treated waste-activated sludge. *Water Research* 35(4): 1038-1046.

- Chu C. P., Lee D. J., Chang B.-V. and You C. S. (2002a). "Weak" ultrasonic pre-treatment on anaerobic digestion of flocculated activated biosolids. *Water Research* 36: 2681- 2688.
- Chu C. P., Lin W. W., Lee D. J., Chang Ben-Ven, Peng X. F. (2002b). Thermal treatment of waste activated sludge using liquid boiling. *Journal of Environmental Engineering*: 1100-1103.
- Chu L., Yan S., Xing X.-H., Sun X., Jurcik B. (2009). Progress and perspectives of sludge ozonation as a powerful pretreatment method for minimization of excess sludge production. *Water Research* 43: 1811-1822.
- Chu L.-B., Yan S.-T., Xing X.-H., Yu A.-F., Sun X.-L., Jurcik B.(2008). Enhanced sludge solubilization by microbubble ozonation. *Chemosphere* 72: 205-212.
- Climent M., Ferrer I., Baeza M. del M., Artola A., Vázquez F., Font X. (2007). Effects of thermal and mechanical pretreatments of secondary sludge on biogas production under thermophilic conditions. *Chemical Engineering Journal* 133: 335–342.
- Comninellis C., Kapalka A., Malato S., Parsons S. A., Poullos I., Mantzavinos D. (2008). Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D. *J Chem Technol Biotechnol* 83: 769-776.
- Dewil R., Baeyens J., Goutvrind R. (2006). Ultrasonic Treatment of Waste Activated Sludge. *Environmental Progress* 25 (2): 121-128.
- Doğan I., F. Sanin D. (2009). Alkaline solubilization and microwave irradiation as a combined sludge disintegration and minimization method. *Water Research* 43: 2139-2148.
- Drouin M., Lai C.K., Tyagi R.D., and Surampali R.Y. (2007). *Bacillus licheniformis* protease as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process. *Proceedings of IWA conference on Moving Forward: Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial, and Public Synergy*. New Brunswick, Canada.
- El-Hadj T. B., Dosta J., Márquez-Serrano R., Mata-Álvarez J. (2007). Effect of ultrasound pretreatment in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion with emphasis on naphthalene and pyrene removal. *Water Research* 41: 87- 94.
- El-Hadj T. B., Dosta J., Mata-Álvarez (2006). Biodegradation of PAH and DEHP micro-pollutants in mesophilic and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Water Sci. Technol.* 53 (8): 99-1-7.
- Erden G., Filibeli A. (2010). Improving anaerobic biodegradability of biological sludges by Fenton pre-treatment: Effects on single stage and two-stage anaerobic digestion. *Desalination* 251 (1-3): 58-63.
- Eskicioglu C., Kennedy K. J. , Droste R. L. (2006). Characterization of soluble organic matter of waste activated sludge before and after thermal pretreatment. *Water Research* 40: 3725-3736.
- Eskicioglu C., Prorotb A., Marinc J., Drostec R. L., Kennedy K. J. (2008). Synergetic pretreatment of sewage sludge by microwave irradiation in presence of H₂O₂ for enhanced anaerobic digestion. *Water Research* 42: 4674 – 4682.
- Feng X., Lei H., Deng J., Yu Q., Li H. (2009). Physical and chemical characteristics of waste activated sludge treated ultrasonically. *Chemical Engineering and Processing* 48 (1): 187-194.
- Fountoulakis M. S., Stamalelatou K., Batstone D. J., Lyberatos G. (2006). Simulation of DEHP biodegradation and sorption during the anaerobic digestion of secondary sludge. *Water Sci. Technol.* 54 (4): 119-126.

- Gavala H.N., Yenal U., Ioannis V. S., Westermann P., Ahring B.K. (2003). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of the pretreatment at 70 ° C. *Water Research* 37:4561-4572.
- Gavala. H. N., Yenal U., and Ahring B.K. (2004). Thermal and enzymatic pre-treatment of sludge containing phthalate esters prior to mesophilic anaerobic digestion. *Biotechnology and bioengineering* 85 (5):561-567.
- Gibson R. W., Wang M.-J., Padgett E., Lopez-Real J. M., Beck A. J. (2007). Impact of drying and composting procedures on the concentrations of 4-nonylphenols, di-(2-ethylhexyl) phthalate and polychlorinated biphenyls in anaerobically digested sewage sludge. *Chemosphere* 68: 1352-1358.
- Goel R., Tokutomi T., and Yasui H. (2003). Anaerobic digestion of excess activated sludge with ozone pre-treatment. *Water Sci. Technol.* 47 (12): 207-214.
- Gómez-Henz A., Aguilar-Caballeros M.P. (2003). Social and economic interest in the control of phthalic acid esters. *Trends Anal Chem* 22(11):848-57.
- Gonze E., Pillot S., Valette E., Gonthier Y., and Bernis A. (2003). Ultrasonic treatment of an aerobic activated sludge in a batch reactor. *Chemical Engineering and Processing* 42: 965-975.
- Gröroos A., Kyllönen H., Korpijärvi, Pirkonen P., Paavola T., Jokela J. and Rintala J. (2005). Ultrasound assisted method to increase soluble chemical oxygen demand (SCOD) of sewage sludge for digestion. *Ultrasonic Sonochemistry* 12: 115-120.
- Guanghui Y., Pinjing H., Liming S., Yishu Z. (2009). Enzyme extraction by ultrasound from sludge flocs. *Journal of Environmental Sciences* 21: 204-210.
- Harrison E. Z., Oakes S. R., Hysell M., Hay A. (2006). Organic chemicals in sewage sludges. *Science of the Total Environment* 367: 481-497.
- Haug R.T., LeBrun T.J., Tortorici L.D. (1983). Thermal pre-treatment of sludges, a field demonstration. *J. Water Pollut. Control Fed.* 55: 23-34.
- Horn O., Nalli S., Cooper D., and Jim N. (2004). Plasticizer metabolites in the environment. *Water Research* 38 (2004) 3693-3698.
- Hua I. and Hoffmann M.R. (1997). Optimization of ultrasonic irradiation as an advanced oxidation technology. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2237- 2243.
- Huang M., Li Y., Gu G. (2008). The effects of hydraulic retention time and sludge retention time on the fate of di-(2-ethylhexyl) phthalate in a laboratory-scale anaerobic-anoxic-aerobic activated sludge system. *Bioresource Technology* 99: 8107-8111.
- Jin Y., Li H., Mahar R. B., Wang Z., Nie Y. (2009). Combined alkaline and ultrasonic pretreatment of sludge before aerobic digestion. *Journal of Environmental Sciences* 21: 279-284.
- Kavlock R., Barr D., Boekelheide K., Breslin W., Breyse P., Chapin R., Gaido K., Hodgson E., Marcus M., Shea K., Williams P. (2006). NTP-CERHR Expert Panel update on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology* 22: 291-399.
- Kidak R., Wilhelm A.-M., Delmas H. (2009). Effect of process parameters on the energy requirement in ultrasonical treatment of waste sludge. *Chemical Engineering and Processing* 48: 1346-1352.

- Kilonzo P. M., Margaritis A. (2004). The effects of non-Newtonian fermentation broth viscosity and small bubble segregation on oxygen mass transfer in gas-lift bioreactors: a critical review. *Biochemical Engineering Journal* 17: 27–40.
- Kim J., Park C., Kim T.-H., Lee M., Kim S., Kim S.-W., Lee J. (2003). Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95 (3): 271-275.
- Kitis M., Adams C. D., Daigger G. T. (1999). The effects of Fenton's reagent pre-treatment on the biodegradability of non-ionic surfactants. *Wat. Res.* 33 (11): 2561-2568.
- Laborde J.L., Bouyer C., Caltagirone J.P., Gbrard A. (1998). Acoustic bubble cavitation at low frequencies. *Ultrasonics* 36: 589-594.
- Lachhab K., Tyagi R.D. , Valéro J.R. (2001). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry* 37: 197–208.
- Langford K. H., Lester J.N. Fate and behaviour of endocrine disrupters in Wastewater Treatment Processes. In: Birkett J.W., Lester J.N., editors. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. London: CRC Press LLC and IWA publishing; 2003. p. 103-43.
- Li H., Jin Y., Mahar R. B., Wang Z., Nie Y. (2008). Effects and model of alkaline waste activated sludge treatment. *Bioresource Technology* 99: 5140-5144.
- Li Y.Y., and Noike T. (1992). Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by thermal pre-treatment. *Water Sci. Technol.* 26: 857–866.
- Liao P.H., Wong W.T. and Lo K.V. (2005). Release of phosphorus from sewage sludge using microwave technology. *J. Environ. Eng. Sci.* 4: 77-81.
- Lin J.-G., Ma Y.-S., Chao A. C., Huang C.-L. (1999). BMP test on chemically pretreated sludge. *Bioresource Technology* 68: 187-192.
- Liu C., Xiao B., Dauta A., Peng G., Liu S., Hu Z. (2009). Effect of low power ultrasonic radiation on anaerobic biodegradability of sewage sludge. *Bioresource Technology* 100: 6217-6222.
- Liu J.C., Lee C.H., Lai J.Y., Wang K.C., Hsu Y.C. and Chang B.V. (2001). Extracellular polymers of ozonized waste activated sludge. *Water Sci. Technol.* 44 (10): 137-142.
- Lo K. V., Liao P. H., and Yin G. Q. (2008). Sewage sludge treatment using microwave-enhanced advanced oxidation processes with and without ferrous sulfate addition. *J Chem Technol Biotechnol* 83: 1370-1374.
- Lopes de Morais J., Zamora P. P. (2005). Use of advanced oxidation processes to improve the biodegradability of mature landfill leachates. *Journal of Hazardous Materials* B123: 181-186.
- Lu M.-C., Lin C.-J., Liao C.-H., Ting W.-P., and Huang R.-Y. (2001). Influence of pH on the dewatering of activated sludge by Fenton's reagent. *Wat. Sci. Technol.* 44 (10): 327-332.
- Manterola G., Uriarte I., Sancho L. (2008). The effect of operational parameters of the process of sludge ozonation on the solubilisation of organic and nitrogenous compounds. *Water Research* 42: 3191-3197.
- Mao T. and Show K. (2007). Influence of ultrasonication on anaerobic bioconversion of sludge. *Water Environment Research* 79 (4): 436-441.

- Mark G., Tauber A., Laupert R., Schuchmann Heinz-Peter, Schulz D., Mues A., and Clemen von Sonntag (1998). OH-radical formation by ultrasound in aqueous solution – Part II: Terephthalate and Fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield. *Ultrasonic Sonochemistry* 5: 41-52.
- Marttinen S. K., Hänninen K., Rintala J. A. (2004). Removal of DEHP in composting and aeration of sewage sludge. *Chemosphere* 54: 265-272.
- Marttinen S. K., Kettunen R. H., Rintala J. A. (2003). Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. *The Science of the Total Environment* 301: 1-12.
- Mottet A., Steyer J.P., Déléris S., Vedrenne F., Chauzy J., Carrère H. (2009). Kinetics of thermophilic batch anaerobic digestion of thermal hydrolysed waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* 46: 169-175.
- Müller J. A. (2000). Pretreatment processes for the recycling and reuse of sewage sludge. *Water Science and Technology* 42 (9): 167 – 174.
- Müller J. A. (2001). Prospects and problems of sludge pre-treatment processes. *Water Sci. Technol.* 44 (10): 121 – 128.
- Naddeo V., Belgiorno V., Landi M., Zarra T., Napoli R.M.A. (2009). Effect of sonolysis on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Desalination* 249: 762-767.
- Nalli S., Cooper D. G., Nicell J. A. (2006b). Interaction of metabolites with *R. rhodochrous* during the biodegradation of di-ester plasticizers. *Chemosphere* 65: 1510-1517.
- Nalli S., Cooper D.G., Nicell J.A. (2006a). Metabolites from the biodegradation of di-ester plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Science of Total Environment* 366: 286-294.
- Neyens E., and Baeyens J. (2003a). A review of thermal sludge pre-treatment processes to improve dewaterability. *Journal of Hazardous Materials* B98: 51–67.
- Neyens E., and Baeyens J. (2003b). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials* B98: 33–50.
- Neyens E., Baeyens J., Creemers C. (2003c). Alkaline thermal sludge hydrolysis. *Journal of Hazardous Materials* B97: 295-314.
- Neyens E., Baeyens J., Weemaes M., De heyder B. (2003d). Pilot-scale peroxidation (H₂O₂) of sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials* B98: 91-106.
- Neyens E., Baeyens J., Dewil R., De heyder B. (2004). Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering, *Journal of Hazardous Materials* 106B: 83-92.
- Nges I. A., Liu J. (2009). Effects of anaerobic pre-treatment on the degradation of dewatered-sewage sludge. *Renewable Energy* 34: 1795–1800.
- Oliver Roly, May Eric, Williams J. (2007). Microcosm investigations of phthalate behaviour in sewage treatment biofilms. *Science of the Total Environment* 372: 605-614.
- Onyeche T.I., Schaläfer O., Bormann, Schröder C. and Sievers M. (2002). Ultrasonic cell disruption of stabilised sludge with subsequent anaerobic digestion. *Ultrasonics* 40: 31-35.
- Özbek B., Gayik S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry* 36: 729–741.

- Pakou C., Kornaros M., Stamatelatou K., Lyberatos G. (2009). On the fate of LAS, NPEOs and DEHP in municipal sewage sludge during composting. *Bioresource Technology* 100: 1634-1642.
- Park B., Ahn J.-H., Kim J., Hwang S. (2004). Use of microwave pre-treatment for enhanced anaerobic of secondary sludge. *Wat. Sci. Technol.* 50 (9): 17-23.
- Park C., Lee C., Kim S., Chen Y., and Chase H. A. (2005). Upgrading of Anaerobic Digestion by Incorporating Two Different Hydrolysis Processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100 (2): 164-167.
- Parmar N., Singh A., Ward O. P. (2001). Enzyme treatment to reduce solids and improve settling of sewage sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 26: 383-386.
- Pera-Titus M., Garcia-Molina V., Banos M. A., Giménez J., and Esplugas S. (2004). Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Applied Catalysis B: Environmental* 47: 219- 256.
- Petrier C. and Francony A. (1997). Incidence of wave-frequency on the reaction rates during ultrasonic wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* 35 (4): 175-180.
- Protocole pour la validation d'une methode d'analyse en chimie. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. DR-12-VMC Édition : 9 juin 2009.
- Psillakis E., Mantzavinos D., and Kalogerakis N. (2004). Monitoring the sonochemical degradation of phthalate esters in water using solid-phase microextraction. *Chemosphere* 54: 849-857.
- Quan C. S., Liu Q., Tian W. J. , Kikuchi J., and Fan S. D. (2005). Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology* 6 (66): 702-710.
- Roman H.J., Burgess J.E., and Pletschke B.I. (2006). Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge. *African Journal of Biotechnology* 5 (10): 963-967.
- Roslev P., Vorkamp K., Aarup Jakob, Frederiksen K., Nielsen P. H. (2007). Degradation of phthalate esters in an activated sludge wastewater treatment plant. *Water Research* 41: 969-976.
- Salsabil M.R., Laurent J., Casellas M., Dagot C. (2010). Techno-economic evaluation of thermal treatment, ozonation and sonication for the reduction of wastewater biomass volume before aerobic or anaerobic digestion. *Journal of Hazardous Materials* 174 (1-3): 323-333.
- Scheminski A., Krull R. and Hempel D.C (2000). Oxidative treatment of digested sewage sludge with ozone. *Water Sci. Technol.* 42 (9): 151-158.
- Scrimshaw M. D, Lester J.N. Fate and behaviour of endocrine disrupters in sludge treatment and disposal. In: Birkett J.W., Lester J.N., editors. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes*. London: CRC Press LLC and IWA publishing; 2003. p. 145-76.
- Sesay M. L., Özcengiz G., Sanin F. D. (2006). Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water Research* 40: 1359-1366.
- Shanableh A. and Jomaa S. (2001). Production and transformation of volatile fatty acids from sludge subjected to hydrothermal treatment. *Water Sci. Technol.* 44 (9): 129-35.
- Staples C. A., Peterson D. R., Parkerton T. F., Adams W. J. (1997). The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere* 35 (4): 667-749.

- Tanaka S., Kobayashi T., Kamiyama K., Bildan M.L.N.S. (1997). Effects of thermochemical pretreatment on the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* 35 (8): 209-215.
- Tiehm A., Nickel K., and Neis U. (1997). The use of ultrasound to accelerate the anaerobic digestion of sewage sludge. *Wat. Sci. Technol.* 36 (11): 121-128.
- Tiehm A., Nickel K., Zellhorn M., and Neis U. (2001). Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research* 35 (8): 2003-2009.
- Tokumura M., Katoh H., Katoh T., Znad H.T., Kawase Y. (2009). Solubilization of excess sludge in activated sludge process using the solar photo-Fenton reaction. *Journal of Hazardous Materials* 162: 1390-1396.
- Tokumura M., Sekine M., Yoshinari M., Znad H. T., Kawase Y. (2007). Photo-Fenton process for excess sludge disintegration. *Process Biochemistry* 42: 627-633.
- Toreci I., Kennedy K. J., Droste R. L. (2009). Evaluation of continuous mesophilic anaerobic sludge digestion after high temperature microwave pretreatment. *Water Research* 43:1273-1284.
- Torres M. , Lloréns Ma. del C. E. (2008). Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. *Waste Management* 28: 2229-2234.
- U.S. Environmental Protection Agency – Technology transfert network air toxics web site. <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/eth-phth.html>
- Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Valéro J. R., and Surampalli R. Y. (2005). Wastewater sludge as a potential raw material for antagonistic fungus (*Trichoderma* sp.): Role of pre-treatment and solids concentrations. *Water Research* 39: 3587-3596.
- Verma M., Satinder K. B., Riopel A.R., Tyagi R.D., and Surampalli R.Y. (2007). Pre-treatment of wastewater sludge biodegradability and rheology study. *Environmental Technology* 28: 273-284.
- Vidyathi A.S., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y. (2002). Studies on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using wastewater as raw material. *Water Research* 36 (19): 4850-4860.
- Vlyssides A.G., and Karlis P.K. (2004). Thermal-alkaline solubilisation of waste activated sludge as a pre-treatment stage for anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 91: 201-206.
- Wang F., Lu S., , Ji M. (2006). Components of released liquid from ultrasonic waste activated sludge disintegration,. *Ultrason. Sonochem.* 13: 334-338.
- Wang F., Wang Y., Ji M.. (2005). Mechanisms and kinetics models for ultrasonic waste activated sludge disintegration. *Journal of Hazardous Materials* B123: 145-150.
- Wang Z., Wang W., Zhang X., Zhang G. (2009). Digestion of thermally hydrolyzed sewage sludge by anaerobic sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 162: 799-803.
- Wawrzynczyk J., Recktenwald M., Norrlöw Olof, Dey E. S. (2007). Solubilisation of sludge by combined chemical and enzymatic treatment. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (17): 1994-1999.
- Weemaes M. P. J. and Verstraete (1998). Evaluation of current wet sludge disintegration techniques. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73: 83-92.
- Weemaes M., H Grootaerd., Simoens F., and Werstraete W. (2000). Anaerobic digestion of ozonized biosolids. *Water Research* 34 (8): 2330- 2336.

- Whiteley C.G., Lee D.-J. (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 291-316.
- Whittington-Jones K.J., Molwantwa J.B., Rose P.D. (2006). Enhanced hydrolysis of carbohydrates in primary sludge under biosulfidogenic conditions. *Water Research* 40: 1577-1582.
- Wilson C. A., Novak J. T. (2009). Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. *Water research* 43: 4489-4498.
- Yan S., Chu L., Xing X., Yua A.-F., Sun X.-L., Jurcik B. (2009). Analysis of the mechanism of sludge ozonation by a combination of biological and chemical approaches. *Water Research* 43: 195-203.
- Yeom I.T., Lee K.R., Ahn K.H. and Lee S.H. (2002). Effects of ozone treatment on the biodegradability of sludge from municipal wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 46 (4 – 5): 421-425.
- Yezza A., Tyagi R. D., Valéro J. R. and Surampalli R. Y. (2005). Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotixicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. *World of Microbiology & Biotechnology* 21: 1165-1174.
- Yin X., Han P., Lu X., Wang Y. (2004). A review on the dewaterability of bio-sludge and ultrasound pretreatment. *Ultrasonics Sonochemistry* 11: 337-348.
- Yoon J., Lee Y. and Kim S. (2001). Investigation of the reaction pathway of OH radicals produced by Fenton oxidation in the conditions of wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 44 (5): 15–21.
- Yu G.-H., He P.-J., Shao L.-M., He P.-P. (2008a). Toward understanding the mechanism of improving the production of volatile fatty acids from activated sludge at pH 10.0. *Water Research* (42): 4637-4644.
- Yu G.-H., He P.-J., Shao L.-M., Zhu Y.-S. (2008b). Extracellular proteins, polysaccharides and enzymes impact on sludge aerobic digestion after ultrasonic pretreatment. *Water Research* 42: 1925-1934.
- Zhang G., Yang J., Liu H., Zhang J. (2009). Sludge ozonation: Disintegration, supernatant changes and mechanisms. *Bioresource Technology* 100: 1505-1509.
- Zhang H., Choi H. J., Huang C.-P. (2005). Optimization of Fenton process for the treatment of landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials* B125: 166-174.
- Zhang P., Chen Y., Zhou Q. (2009). Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH. *Water Research* 43: 3735-3742.



CHAPITRE 2 EFFET DE PRÉTRAITEMENT SUR LA PRODUCTION DES PRODUITS À VALEUR AJOUTÉE

(Résultats des objectifs 1; 2 et 3)

2.1. Ultrasonification of wastewater sludge – Consequences on biodegradability and flowability

T. T. H. Pham^a, Satinder K. Brar^a, R. D. Tyagi^{a*} and R.Y. Surampalli^b

^aINRS-ETE, Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec (QC) G1K 9A9, Canada

^bUS Environmental Protection Agency, P.O. Box 17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

Journal of Hazardous Materials 163 (2009), 891-898



Résumé

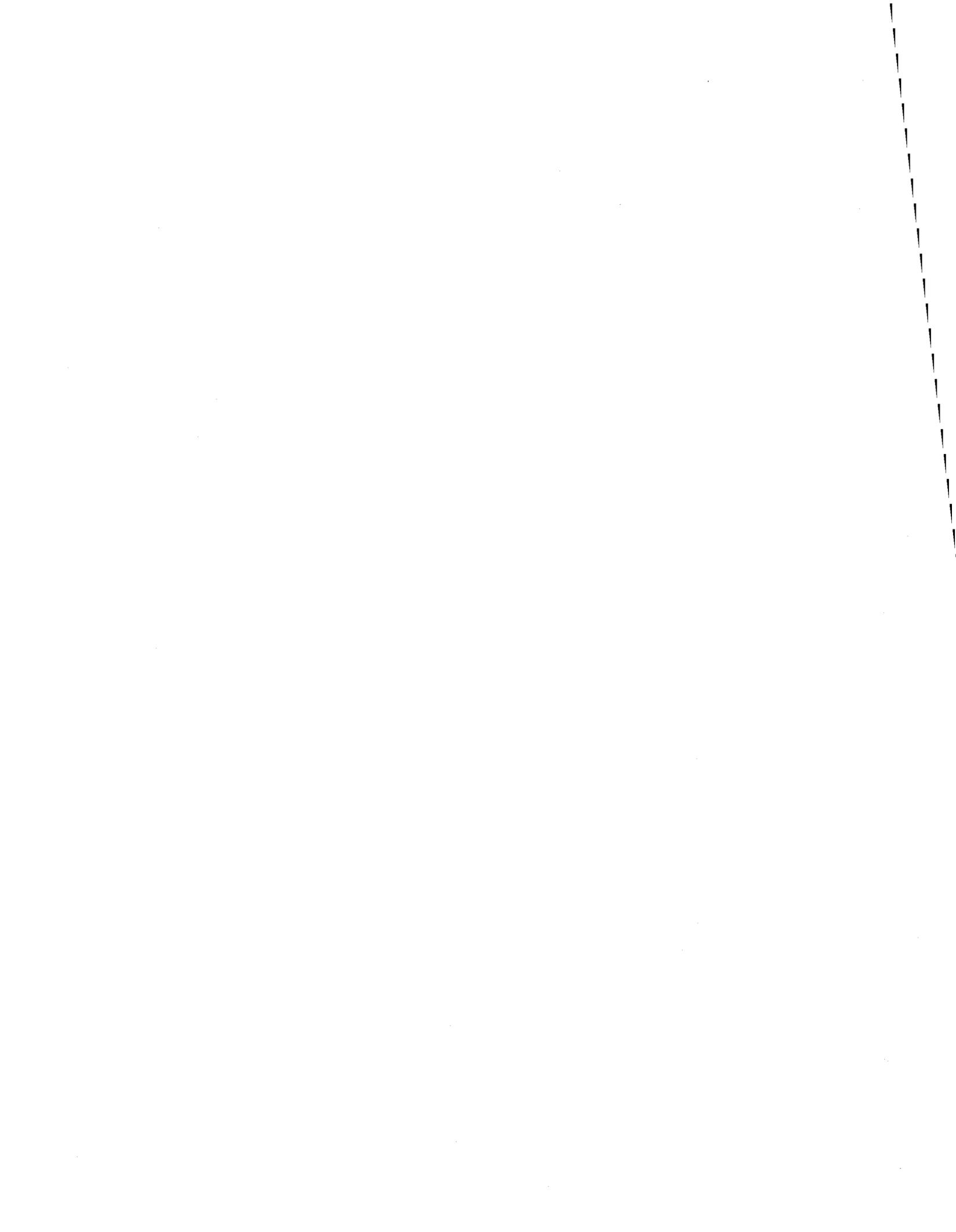
Le prétraitement des boues d'épuration par l'ultrasonification à une fréquence de 20 kHz a été réalisé en utilisant l'équipement des ultrasons entièrement automatisé à l'échelle laboratoire. Différentes concentrations en solides totaux (ST) des boues d'épuration, des intensités ultrasoniques, et des temps d'exposition ont été étudiés pour l'optimisation. Les paramètres optimaux provisoires ont été déterminés par des expériences de tamisage. Les paramètres de l'ultrasonification ont ensuite été optimisés avec un plan composite centre et la méthodologie de réponse en surface. L'effet de l'ultrasonification a été évalué par les augmentations de la solubilisation (en termes de demande chimique en oxygène soluble-DCOS) et de la biodégradabilité (en termes de consommation de ST dans la digestion aérobie) des boues d'épuration. De plus, le paramètre rhéologique des boues d'épuration, à savoir, la viscosité a également été mesurée pour déterminer la pertinence des boues d'épuration pour le traitement des procédés traditionnels, ainsi que la fermentation submergée, une étape majeure pour la production de produits à valeur ajoutée à partir des boues. Il a été observé que l'intensité ultrasonique et la durée d'exposition ont eu un impact important suivi par la concentration en solides sur l'efficacité du processus d'ultrasons. Les conditions optimales du prétraitement par l'ultrasonification ont été 0,75 W/cm² d'intensité ultrasonique, 60 min de temps d'exposition, et 23 g/ L de ST. La solubilisation et la biodégradabilité ont été obtenues de 45,5 % et 56 %, respectivement. La faculté d'écoulement des boues traitées par l'ultrasonification en termes de viscosité a montré un comportement exponentiel à différentes concentrations en St, et les comportements pseudoplastique et thixotropique similaires aux boues non traitées. Néanmoins, l'ampleur des valeurs de viscosité des boues traitées par l'ultrasonification a toujours été inférieure à celui des boues non traitées.

Mots clés: Biodégradabilité, boue d'épuration, écoulement, méthodologie de réponse en surface, ultrasonification.

Abstract

The present study deals with pre-treatment of wastewater sludge by ultrasonic waves at a frequency of 20 kHz using fully automated lab-scale ultrasonification equipment. Different wastewater sludge solids concentrations, ultrasonification intensities, and exposure times of pre-treatment were investigated for the optimization of the ultrasonification treatment process. The parameters of pre-treatment process were optimized by using response surface methodology. A 23 central composite design was performed for optimization. The screening experiment step used steepest ascent methodology to determine the optimal domain. The effect of ultrasonification treatment was assessed in terms of increase in soluble solids and the biodegradability of the wastewater sludge. In addition, a rheological parameter of wastewater sludge, namely, viscosity was also measured to ascertain the suitability of wastewater sludge for conventional treatment processes as well as submerged fermentation, a major step for the production of value-added products from sludge. It was observed that the ultrasonification intensity and pre-treatment exposure time significantly affected the efficiency of the ultrasonification process; solids concentration was the third most significant influence. The optimal conditions of ultrasonic pre-treatment were 0.75 W/cm² ultrasonification intensity, 60 min, and 23 g/L total solids concentration. The increases in soluble chemical oxygen demand and biodegradability, by an aerobic sludge digestion process, in terms of total solids consumption were 45.5 and 56 %, respectively. The flowability of ultrasonicated sludge in terms of viscosity showed exponential behaviour at different total solids concentrations, and pseudoplastic and thixotropic behaviour similar to raw sludge. Nevertheless, the magnitude of viscosity values of ultrasonicated was always lower than the raw sludge.

Key words: Wastewater sludge, ultrasonification, biodegradability, flowability, response surface method.



1. Introduction

Increasing stringent regulations on disposal of wastewater sludge (WWS) have led to efforts towards reuse of sludge as biosolids for agricultural application. Value addition of WWS by utilizing it as a raw material for commercially viable products such as, biopesticides, biofertilizers, bioplastic and enzymes is a novel sustainable approach of sludge management [1, 2]. In fact, bioconversion is more advantageous than conventional sludge disposal techniques such as, land filling and incineration, due to its positive impact on the environment and economy. However, the limiting factor for reuse of WWS as alternative material in the bioconversion process is that WWS is insoluble, possesses low homogeneity and contains recalcitrants. Additionally, WWS includes, cell walls and membranes of prokaryotes composed of complex organic materials such as, peptidoglycan, teichoic acids, and complex polysaccharides, which are not readily biodegradable [3]. In this context, several pre-treatment methods such as, thermal and thermo-alkaline hydrolysis and partial oxidation have been effectively applied to enhance biodegradability of WWS with encouraging results in particular for *Bacillus thuringiensis* biopesticides and *Bacillus licheniformis* proteases production [4 – 6]. The exposure of insoluble, non-biodegradable (recalcitrant organic matter), and the microbial cells to pre-treatment process ruptures the cell wall, and membrane followed by release of the intracellular organics into the bulk solution, which in turn enhances overall digestibility. Likewise, the high viscosity of sludge which affects mass transfer (oxygen and nutrients) could be modified for improving the efficacy of value addition of WWS using pre-treatment strategies.

Ultrasonic disintegration was actually applied for the disruption of microbial cells in order to extract intracellular material. Subsequently, several authors have reported the successful application of ultrasonification as pre-treatment process for sludge

stabilization [3, 7]. Ultrasonic wave is a pressure wave that propagates through a medium, resulting in vast amount of energy dissipation, and violent collapse of gas and vapour bubbles (termed “acoustic cavitation”), which possibly induces many physico-chemical effects [8]. The hydromechanical shear forces produced by ultrasonic cavitation disrupt the cells in sludge, leading to release of organic substances of sludge into the liquid phase [9]. The sludge disintegration was also enhanced by the increase of temperature in the bulk liquid during ultrasonification [10]. In fact, ultrasonification would be a prospective method in augmenting sludge biodegradability for value addition by solubilization of organic matter, decrease in sludge viscosity and increase in its homogeneity. However, to date, none of the studies discussed the enhancement of biodegradability for sludge value addition, i.e. production of biopesticides, bioplastics, enzymes, bioflocculants, among others using ultrasonification as pre-treatment. Most of the literature pertains to the augmentation of rate of anaerobic digestion for increased biogas production, stability and dewaterability [11, 12].

The objective of the present work is to study the optimization of the ultrasonification process to improve the solubilization and the biodegradability of wastewater sludge using response surface methodology. Furthermore, the effect of ultrasonification process and solids concentration on rheology of wastewater sludge in terms of viscosity was studied to ascertain its actual suitability as a raw material for sludge value addition via fermentation.

2. Materials and methods

2.1. Sludge

Secondary sludge (cyclic backwash of installed BIODROF® biofilter to remove excess biofilm and/or, biomass chunks) used in the study was obtained from CUQ (Communauté urbaine de Québec, Canada) aerobic wastewater treatment facility. The sludge total solids (TS) were concentrated from 1.5% (w/v) to higher TS concentrations by gravity settling and centrifugation of the settled sludge at 1600 g for 3 min in a Sorvall RC 5C plus Macrocentrifuge (rotor SA-600). The supernatant was discarded; the particulates were diluted with demineralized water to obtain three concentrations (20, 30 and 40 TS g/L) and was homogenized in a Waring™ blender for 30 s. Maximum storage period of sludge was 1 week at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ to minimize microbial degradation.

2.2. Ultrasonification pre-treatment

The ultrasonification was carried out using ultrasonic homogenizer Autotune 750W (Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, IL, USA). The ultrasonification equipment was operated at frequency of 20 kHz, using platinum probe with tip diameter of 25 mm. Four hundred mL of wastewater sludge sample at ambient temperature was placed in a 1 L beaker. The ultrasonic probe was dipped in such a way that it was immersed 2 cm into the sludge. The process efficiency was evaluated by measuring the improvement of solubilization of sludge organic matter in terms of the ratio of change in SCOD after ultrasonification to TCOD (Eq. 1) and biodegradability in terms of TS reduction during aerobic degradation process (Eq. 2).

$$\text{SCOD increment} = \frac{\text{SCOD after ultrasonification} - \text{SCOD before ultrasonification}}{\text{TCOD}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Biodegradability} = \left(1 - \frac{\text{TS concentration after biodegradation}}{\text{TS concentration before biodegradation}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

2.3. Response surface methodology

Application of response surface methodology for the optimization of ultrasonification will help in overcoming the limitations of time consuming conventional optimization method of 'one-factor-at-a-time' (at each step, a single factor is changed while other factors remain constant). Moreover, the statistical optimization method can evaluate the effective factors and help in building models to study interaction and select optimum conditions of variables for a desirable response. Various stages of the optimization scheme are presented in Fig. 1. In the response surface method, the factors of pre-treatment processes, namely, ultrasonification intensity, ultrasonification time and TS concentration were considered as independent variables, and SCOD increment and biodegradability of pre-treated sludge as dependent variables. To begin with, the screening experiments were carried out to determine the direction of optimal domain of each process. Two-level fractional factorial design (FFD) was employed in the screening step. Once the provisional optimal values were determined, a central composite design (CCD) was used to verify the significance of impact of each factor on the response of SCOD increment and biodegradability. The optimization step required 14 experiments and 6 replicates in all. The levels of each factor along with their codes and values of two experimental designs are listed in Table 1. After running the CCD experiments, a second-order polynomial regression equation was fit to the data (Eq. 3). Analysis of data by analysis of variance (ANOVA), regression analysis and the response surface methodology were performed with the statistical software of STATISTICA (version 6, Statsoft Inc., US).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1} \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

where, Y = predicted response of the dependent variable; X_i and X_j = independent variables influencing the response of Y; β₀ = constant of the second-order equation; β_i =

linear regression coefficient of each independent variable; β_{ii} = quadratic regression coefficient of each independent variable; and β_{ij} = regression coefficient of interactions between two independent variables.

The SCOD increment and biodegradability of raw (as control) and ultrasonicated sludge at TS concentrations as listed in Table 1 were measured in both screening and optimization experiments.

2.4. *Aerobic biodegradability test*

Examination of biodegradability was carried out by inoculating the ultrasonically pre-treated and raw sludges with microbial consortia of 2 % (v/v) of fresh activated wastewater sludge (1.5 mL) at solids concentration of 25 g/L followed by incubation at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ at 150 rpm on a rotary shaker for 20 days. Oxygen corresponded to the oxygen entrained from the atmosphere into the shaking flasks on a rotary shaker. The biodegradability was assessed by the decrease in TS consumed by the microorganisms after incubation (20 days). At the end of incubation, the volume loss due to evaporation was readjusted to 75 mL with Milli-Q water.

Our previous studies have demonstrated that pretreatment of sludge (thermal-chemical hydrolysis) resulted in increase in biodegradability and concomitantly increased the yield of value-added products, namely, *Trichoderma ssp.* and *Bacillus thuringiensis* based biopesticides (Verma *et al.*, 2006). Conidia concentration increased from 10^5 to 10^7 colony forming units/mL for *Trichoderma ssp.* and the entomotoxicity increased from 12 to 16 billion spruce budworm units/liter for *Bacillus thuringiensis* after pre-treatment. Hence, pre-treatment increased the yield of value-added products brought about by the increase in biodegradability of wastewater sludge.

Therefore, in this research biodegradability was used as a parameter to assess the effectiveness of the ultrasonification sludge pre-treatment process of WWS to increase the concentration yield of value added products required to make the process economical.

2.5. *Parameter Analysis*

General

Total solids (TS), volatile solids (VS), suspended solids (SS), dissolved solids (DS), volatile suspended solids (VSS), and chemical oxygen demand (COD) were determined as per Standard Methods [13]. Chemical oxygen demand was measured in total sludge (TCOD) and in supernatant (SCOD) by centrifuging at 7650 g for 15 min at 4°C, followed by filtration of the sludge supernatant. Changes in general parameters in raw and ultrasonicated sludge are presented in Table 2.

Viscosity

Rheological properties in terms of viscosity of raw and ultrasonicated sludges were determined by using a rotational viscometer Brookfield DVII PRO+ (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Stoughton, MA, USA) equipped with Rheocalc32 software. Two different spindles, namely, SC-34 (small sample adaptor), and ultra-low centipoise adapter were used with a sample cup volume of 18 mL/50 mL (spindle dependent). The gaps between spindle and respective sample chamber were 1.235 and 4.830 mm, respectively for ultralow (viscosity range, 1.0-30 mPas), and small sample (viscosity range ≥ 30 mPas) adapter spindle to accommodate sludge flocs. The calibration and viscosity testing procedure for each spindle was carried out as per the instrument manual. Time dependent profile was studied at low shear rate (3.67 s^{-1}) and viscosity of the sludge sample at different TS concentrations was measured at 36.69 s^{-1} . The shear rate behaviour was determined from 1.4 to 56 s^{-1} . All measurements were done at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and viscosity was referred to as “apparent viscosity”. The viscosity data acquisition and

analysis was carried out using software, Rheocalc V2.6 (comprising commands, B.E.A.V.I.S. – Brookfield Engineering Advanced Viscometer Instruction Set, allowed the creation of programs to control connected instrumentation and manipulate data acquisition).

3. Results and discussion

3.1. Screening experiments

The results of screening experiments, including 8 combined runs and 3 runs of replication are shown in Table 3. The highest response of both solubilization and biodegradability was recorded in run no. 4 at ultrasonification intensity of 0.75 W/cm^2 , with time duration of 60 min at a TS concentration 23 g/L. The SCOD increment and solids degradation were highest at 45.5 and 56%, respectively. It was observed that the ultrasonification intensity and ultrasonification time had substantial impact on the solubilization as well as biodegradation of sludge. The values of SCOD increment were higher than those obtained by Bougrier *et al.* [14], in which the ratio of SCOD/TCOD after ultrasonification treatment at 20 kHz frequency in 10 minutes was 32% at a specific energy of 14 550 KJ/kg. These values were drawn from the graphs and also re-calculated using Eq. (2), $E = Pt/\nu TS$; where, P = ultrasonic power (W) calculated from ultrasonification intensity, t = ultrasonification time (sec), ν = sample volume (L) and TS concentration (g/L). The lower ratio of SCOD/TCOD reported by these authors was due to the shorter duration of ultrasonification. In fact, it has been reported that the sonication of biological sludge is a multi-stage process [15]. In the first stage (0–20 min), mechanical forces break down the porous flocs into small particles; in the second stage (20–60 min) ultrasonification solubilizes extracellular polymers and causes cell lysis releasing intracellular materials (inactivating the biomass). The transformation of solid-state bound organic compounds into a soluble form could be induced continuously by the elevated bulk temperature during sonication. Therefore, the required ultrasonification time was 60 min for sludge disintegration resulting in decrease in VSS further aided by the hydromechanical shear forces and the increase of bulk temperature. The effective impact of the lower solids concentration (23 g/L) on solubilization and biodegradation of sludge was also in

agreement with the results of Verma *et al.* [2] who reported the optimal TS concentration as 20 g/L for the biodegradability of alkaline thermal hydrolyzed sludge to produce *T.viride* based biopesticides. At higher solids concentration, the micro-organisms could be inhibited by higher amount of substrates and some unknown compounds (produced during the pre-treatment process) in sludge [4]. Moreover, high solids concentration leads to mass and oxygen transfer limitation during biodegradation.

Furthermore, the specific supplied energy calculated using Equation, $E = Pt/vTS$ is also given in Table 3. Taking into account the supply of energy, the run no. 2 in which 0.75 W/cm² of ultrasonification intensity, 20 min of ultrasonification time and 23 g/L of total solids with a specific energy of 3456.5 kJ/kg was chosen as optimal condition which gives 37.56% of SCOD increment and 32.6% increment of biodegradability. However, based on percent SCOD increment (run no. 4), 45.5% solubilization and 56% biodegradability gave the best results for solids concentration of 23 g/L. Thus, run no.4 was preferred to set the provisional optimum conditions for the optimization experiments.

3.2 Optimization studies

Effect of ultrasonification on biodegradability of sludge

The results of 2³ CCD experiments are presented in Table 4 showing the highest TS reduction obtained from the first experiment of 36% at ultrasonification intensity of 0.62 W/cm², in 50 min and 15 g/L TS concentration. Under these conditions, the observed biodegradability increase was from 26.3 to 36%, at TS concentration of 15 g/L for raw and ultrasonicated sludges, respectively. The biodegradability enhancement by ultrasonification is lower compared to alkaline thermal hydrolysis (26.5 – 44.5%) as reported in the studies of Verma *et al.* [2]. The disparity could be explained by the combined effect of alkaline hydrolysis at high temperature (121°C) as a physicochemical process on biodegradability enhancement. Meanwhile, the effect of ultrasonification as a

physical process on biodegradability is only mechanical. In the light of the results obtained in this study, it is possible that the biodegradability can be improved if ultrasonification was combined with chemical process.

The statistical significance of the second-order polynomial model was verified by ANOVA. The analysis indicated that the second-order polynomial model resulted in a determination coefficient, r^2 , of 0.87, which ensured a satisfactory adjustment of the quadratic model to the experimental data. Table 5 presents the estimation of effects of each factor and their interactions on the biodegradability along with the regression coefficients of each component determined by regression analysis. The evaluation of statistical significance of the three factors and their interaction was based on probability (p) values. The quadratic effects of the ultrasonification intensity (X_1^2) is highly significant ($p < 0.001$), followed by the quadratic effects of exposure time and solids concentration ($p < 0.01$). The linear effect of 3 factors and their interactive effects are of very little significance (p values are presented in Table 5).

The regression coefficients were then fitted in Equation 3 to give the following model (Eq. 4). However, the regression coefficients which were found insignificant ($p < 0.01$) were excluded from the model.

$$Y = 5.98 - 0.18*X_1 + 0.002*X_1^2 - 0.058*X_2 + 0.0004*X_2^2 + 0.0005*X_3^2 \quad (4)$$

The linear coefficient of the ultrasonification intensity (X_1) has negative effect and it is highly significant ($p < 0.001$). The linear coefficient of the treatment time (X_2) having negative effect is statistically significant ($p < 0.01$). All quadratic coefficients comprising 3 factors have positive effects and the quadratic coefficient of ultrasonification intensity (X_1^2) is the most significant. The regression coefficients of interaction of each pair of the independent variables are not significant. The response surface graphs are shown in Figs. 2 as a function of two factors at a time, holding the third factor at fixed zero level and are in

fact more helpful in interpreting the main effect and the interactions. In order to arrive at the choice of fixed parameters using response surface methodology, following sequential procedure was employed: a) fix one independent variable at temporary optimum value obtained from the screening experiments as discussed earlier; b) choose two independent variables to construct 3-D graphs; and c) finally obtaining the surface response graphs.

Fig. 2a shows the response for the interactive factors; ultrasonification intensity (X_1) and exposure time (X_2), when the TS concentration was 23 g/L. Higher biodegradability was observed at low ultrasonification intensity and in short exposure time. The highest percentage of solids reduction was obtained in the shortest time duration of 40 min and lowest ultrasonification intensity of 0.51 W/cm². Maximum biodegradability under these conditions was predicted to be 65%. Furthermore, the response also increased when the ultrasonification intensity was increased and the time was shortened, and vice-versa. The interaction between ultrasonification intensity and solids concentration presented in Fig. 2b also suggested that low ultrasonification intensity was more efficient, but it must be associated with high solids concentration. The predicted maximum biodegradability was 58% at 36 g/L TS, 0.51 W/cm² ultrasonification intensity in 60 min. Fig. 2c revealed that increase in TS concentration and exposure time did not have any effect on biodegradability when the ultrasonification intensity was kept at 0.75 W/cm². Maximum solids reduction (53%) was obtained at the lowest TS concentration of 8 g/L and the shortest time duration of 40 min.

The detailed analysis of significance of the factors on response of biodegradability showed that the ultrasonification intensity exhibited a major effect on improving biodegradability. This parameter relates to ultrasonic power, so that increase in ultrasonification intensity leads to increase in power input. However, in terms of improving biodegradability, it did not seem reasonable to have ultrasonification intensity higher than

0.75 W/cm². Lower solids concentration would be more efficient for biodegradability. This could be explained by the absorption of the ultrasound wave by the particles, and the interruption of propagation of ultrasound energy in the slurry phase, leading to reduced cavitation effect [3, 12]. From the model based on response surface methodology, the optimal conditions of ultrasonic pre-treatment of secondary sludge at 20 kHz were identified as follows: 0.75 W/cm² ultrasonification intensity, 60 min with 23 g/L TS concentration. Taking into account specific supplied energy, the optimal conditions gave energy input of 10,356 kJ/kg TS at biodegradability of 36.5%. It was reported that biogas production of ultrasonicated sludge increased for specific energy input of 7 000 kJ/kg TS and then remained constant for 7 000 to 15 000 kJ/kg TS [14]. There was a possible link between biodegradability and solubilization, as the increase in solubilization by energy input had the same evolution tendency as biodegradability (discussed below).

Effect of ultrasonification on solubilization of sludge

SCOD increment (solubilisation) has been adopted as a measure of ultrasonic disintegration efficiency, and supposed to improve biodegradability. In fact, under powerful hydro-mechanical shear forces generated from sudden and violent collapse of microbubbles, extracellular polymeric substances (EPS) considered as matrix that embedded cell sludge were degraded [16]. Consequently, the organic matter contained in EPS and cells was solubilised, coming under perpetual attack of collapsing cavitation bubbles, increasing the tendency to augment biodegradability. According to the estimation of effects of different parameters represented in Table 5, no remarkable effects of each factor and their interaction on solubilization were observed, except that the linear effect of solids concentration was highly significant ($p < 0.001$). Nevertheless, the response surface graph of solubilization affected by the ultrasonification intensity and time at constant TS concentration of 23 g/L (Fig. 3) showed that highest solubilization occurred at 0.75 W/cm²

ultrasonification intensity in 60 min. In terms of ultrasonic energy, the highest SCOD increment (45.5%) and biodegradability (56%) were obtained at specific energy input of 10356 kJ/kg TS. These results are similar to earlier studies reported on ultrasonicated waste-activated sludge [3, 14]. These studies reported that maximum solubilization (35%) in terms of SCOD was obtained for supplied energy of 10 000 kJ/kg TS. However, the biodegradability measurements were not direct and instead were reported in terms of biogas production which was found to be 1.4 times higher than untreated sludge. The results suggested that there was a correlation between improvement of solubilization and biodegradability by ultrasonification. Moreover, the floc structure of sludge VSS was broken down during ultrasonification resulting in decrease in VSS and hence solubilization (Table 2). However, solubilization does not necessarily change the total carbon content of the sludge, but will result in an increase in biodegradability, thus correlating the two parameters.

3.3 Flowability of sludge (Viscosity)

Effect of solids concentration

The flowability of raw and ultrasonicated sludges was studied in terms of the correlations of viscosity with TS concentration and shear rate. The curves presenting the relation between viscosity and TS concentration of raw and ultrasonicated sludges fitted well into the exponential equations ($\text{Viscosity}_{\text{RS}} = 1.136e^{1.2008 \text{ TS}}$; $R^2 = 0.9549$; $\text{Viscosity}_{\text{ULS}} = 1.1985e^{1.0953\text{TS}}$; $R^2 = 0.9282$) as shown in Fig. 4. The exponential increase of viscosity with TS concentration was in agreement with earlier viscosity studies on raw, anaerobic and aerobic digested, and thermal hydrolyzed wastewater sludges [1]. Moreover, particle concentration increase, prompt formation of flocs due to high amount of EPS in sludge possessing higher solids concentration could lead to high viscosity [17, 18]. The constant values of two exponential equations can be used as control parameter for mixing

and pumping in sludge treatment processes [19]. As shown in Fig. 4, there was not much change in the apparent viscosity by ultrasonification process at 10 g/L TS. The decrease of viscosity by ultrasonification was observed from 20 g/L of TS. The apparent viscosity ranged from 2.89 – 359.7 and 2.51– 199.2 mPas, respectively, for raw and ultrasonicated sludges at 10 – 40 g/L solids concentration. Disintegration of sludge flocs, cell lysis, and cleavage of interactions due to hydroshear forces from acoustic cavitation and the partial hydrolysis of EPS caused by increase in bulk temperature during ultrasonification could be the reasons for the decrease in viscosity of ultrasonicated sludge [9 – 11]. The decline of viscosity played an important role in the increase in the biodegradability of sludge, as this strongly influenced the mass transfer in aerobic degradation. After aerobic digestion, the apparent viscosity decreased from 76.6 to 41 and 72.9 to 11 mPas, respectively, for raw and ultrasonicated sludges at 25 g/L TS concentration. The trend in decrease in viscosity after the digestion of ultrasonicated sludge was in agreement with the data observed for 20-days digested thermal alkaline hydrolyzed sludge [2]. Under aerobic condition, microorganisms consumed sludge solids as substrate and released carbon dioxide and water. As a result, viscosity of digested sludge decreased due to the reduction of sludge solids. Moreover, EPS will also undergo biodegradation during aerobic digestion resulting in free floating sludge flocs [20].

Effect of shear rate and time

The apparent viscosity evolution as a function of time and shear rate was studied at TS concentration of 25 g/L. As shown in Fig. 4, the apparent viscosity decreased from 131.97 to 13.80 mPas with increase in shear rate from 1.4 to 56 s⁻¹, and hence showed shear - thinning behaviour for raw and ultrasonicated sludges. Moreover, at constant shear rate (3.67 s⁻¹), the apparent viscosity (0 – 102 min time range) decreased from 279.94 to 169.96 and 159.9 - 100 mPas, respectively, for raw and ultrasonicated sludges, showing the

thixotropic (time dependent) behaviour of the ultrasonicated sludge. These results are in agreement with earlier studies on anaerobic granular and thermal alkaline hydrolyzed sludges [1, 17]. Notably, the apparent viscosity of ULS reaches a constant value (before the first 30 min) faster than the RS (after 50 min). In fact, a correlation between viscosity and shear rate led to linear behaviour with viscosity of raw sludge being highly affected by the shear rate in comparison to ultrasonicated sludge (results not shown). Briefly, rheological properties in terms of viscosity of wastewater sludge were shown to improve with pre-treatment by ultrasonification process resulting in better mixing and pumping properties in wastewater treatment plants. In fact, viscosity is an important parameter which influences pumping and mixing characteristics of any fluid [21].

When these results are compared with our earlier studies performed on enhancement of biodegradability using thermal chemical hydrolysis [2], the following points come to the fore: a) thermal alkaline hydrolysis includes use of chemicals (NaOH and H₂SO₄), increasing the secondary pollution load, which is absent for ultrasonification; b) thermal treatment will omit the sterilization step for thermal alkaline hydrolysis which may not be the case for ultrasonification necessitating an additional sterilization step due to microbial viability, if the ultrasonicated sludge is to be used for the production of value-added products; and; c) thermal alkaline hydrolysis and ultrasonification might result in formation of potentially more toxic organic compounds, which will determine the efficacy of the process in terms of detoxification of waste streams. Nevertheless, ultrasonification can serve as an efficient pre-treatment tool for aerobic digestion processes and similar treatment processes in a wastewater treatment plant.

Thus, future work is under progress in our laboratory on the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides and thermoalkaline proteases for detergents using

ultrasonicated sludge as a raw material (in bench scale fermenters) to evaluate effects of ultrasonification on value-addition.

4. Conclusions

The present research work on ultrasonification pre-treatment of secondary sludge for the enhancement of biodegradability led to following conclusions:

1. Central composite experimental design supplied enough information for optimization, while reducing the number of individual experiments. Response surface plots were extremely useful in visualizing the effect and interactions of various parameters.
2. Ultrasound power plays an important role in increasing the sludge biodegradability which was determined to be 0.75 W/cm^2 in comparison to control.
3. The ultrasonification exposure time of 60 min must be maintained in order to obtain disruption of flocs as well as cell lysis; and enhanced SCOD increment and biodegradability.
4. Total solids concentration is one of the key parameters affecting ultrasonic disintegration efficiency which was determined to be 23 g/L.
5. The biodegradability and SCOD increment of wastewater sludge was found to be 56 and 45.5%, respectively, under optimal conditions (ultrasonification intensity - 0.75 W/cm^2 ; exposure time - 60 min and TS - 23 g/L).
6. The sludge viscosity decreased on ultrasonification pretreatment. The ultrasonicated sludge bore exponential relationship with TS concentration, and exhibited pseudoplastic and thixotropic behavior.



Acknowledgements

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grants A4984, STP235071, Canada Research Chair), NSERC (DG) and INRS-ETE for financial support. We are thankful to Dr. Simon Barnabé for providing valuable and inciting support during the analysis of results using surface response methodology. The views or opinions expressed in this article are those of the authors and should not be construed as opinions of the U.S. Environmental Protection Agency.

List of Symbols

CCD	Central composite design
EPS	Extracellular polymeric substances
FFD	Fractional factorial design
RS	Raw sludge
SCOD	Soluble chemical oxygen demand (g/L)
TCOD	Total chemical oxygen demand (g/L)
TS	Total solids (g/L)
ULS	Ultrasonicated sludge
VSS	Volatile suspended solids



References

- [1] S. K Brar., M. Verma, R. D. Tyagi, J. R. Valéro, R. Y. Surampalli, Sludge based *Bacillus thuringiensis* biopesticides: Viscosity impacts, *Water Research* 39 (2005) 3001 – 3011.
- [2] M. Verma, S.K. Brar, A.R. Riopel, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, Pre-treatment of wastewater sludge biodegradability and rheology study, *Environmental Technology* 28 (2007) 273-284.
- [3] S.K. Khanal , D. Grewell , S. Sung, J. van Leeuwen, Ultrasound applications in wastewater sludge pretreatment: A review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37 (4) (2007) 277 – 313.
- [4] S.Barnabé, Hydrolyse et oxidation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire *Bacillus thuringiensis* HD-1, PhD Thesis, Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau Terre Environnement, Université du Québec (2004).
- [5] A. Yezza, R. D. Tyagi, J. R. Valéro, R. Y. Surampalli, Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, *World of Microbiology & Biotechnology* 21 (2005) 1165-1174.
- [6] M. Drouin, C.K. Lai, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, *Bacillus licheniformis* protease as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process, *Proceedings of IWA conference on Moving Forward: Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial, and Public Synergy*, New Brunswick, Canada (2007).
- [7] R. Dewil, J. Baeyens, R. Goutvrind, Ultrasonic treatment of waste activated sludge, *Environmental Progress* 25 (2) (2006) 121 – 128.

- [8] A. Tiehm, K. Nickel, M. Zellhorn, U. Neis, Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization, *Water Res.* 35 (8) (2001) 2003-2009.
- [9] T.I. Onyeche, O. Schaläfer, H. Bormann, C. Schröder, M. Sievers, Ultrasonic cell disruption of stabilised sludge with subsequent anaerobic digestion, *Ultrasonics* 40 (2002) 31-35.
- [10] F. Wang, Y. Wang, M. Ji, Mechanisms and kinetics models for ultrasonic waste activated sludge disintegration, *J. Hazard. Materials B123* (2005) 145-150.
- [11] T. Mao, K. Show, Influence of ultrasonification on anaerobic bioconversion of sludge, *Water Environment Research* 79 (4) (2007) 436 – 441.
- [12] S. Na, Y. Kim, J. Khim, Physicochemical properties of digested sewage sludge with ultrasonic treatment, *Ultrasonics Sonochemistry* 14 (2007) 281 – 285.
- [13] APHA, AWWA & WPCF, Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters, 20nd edition, American Public Health Association, Washington, US (1999).
- [14] C. Bourgrier, H. Carrère, J.P. Delgenès, Solubilization of waste-activated sludge by ultrasonic treatment, *Chemical Engineering Journal* 106 (2005)163–169.
- [15] C. P. Chu, Bea-Ven Chang, G.S. Liao, D. S. Jean, D. J. Lee, Observations on changes in ultrasonically treated waste-activated sludge, *Water Research*, 35 (4) (2001)1038-1046.
- [16] E. Neyens, J. Baeyens, R. Dewil, B. De Heyder, Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering, *Journal of Hazardous Materials*, 106B (2004) 83-92.
- [17] A. Pevere, G. Guibaud, E. van Hullebusch, P. Lens, M. Baudu, Viscosity evolution of anaerobic granular sludge, *Biochemical Engineering Journal* 27 (2006) 315 – 322.

- [18] S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, J. R. Valéro, Particle size variations during production of wastewater sludge-based *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Pract. Periodical of Haz., Toxic, and Radioactive Waste Mgmt.* 12 (1) (2008) 30-39.
- [19] I. Seyssiecq, J. Ferrasse, N. Roche, State-of-the-art: rheological characterization of wastewater treatment sludge, *Biochemical Engineering Journal* 16 (2003) 41 – 56.
- [20] Z. W. Wang, Y. Liu, J. H. Tay, Biodegradability of extracellular polymeric substances produced by aerobic granules, *Appl. Microbiol. Biotechnol* 74 (2) (2007) 462-466.
- [21] K. Karim, G. J. Thoma, M. H. Al-Dahhan, Gas-lift digester configuration effects on mixing effectiveness, *Water Res.* 41(14) (2007) 3051-3060.



Table 1 Codes and values of independent variables of experimental designs for screening using response surface methodology

Factor - symbol	Experimental design	Level				
		-2	-1	0	+1	+2
Ultrasonification intensity (W/cm^2) – X_1	FFD		0.27	0.51	0.75	
	CCD	0.56	0.62	0.75	0.86	0.92
Time (min) – X_2	FFD		20	40	60	
	CCD	43	50	60	70	77
Total solids (g/L) – X_3	FFD		23	33	44	
	CCD	10	15	23	31	36

Table 2 Changes in analytical parameters after ultrasonification (at optimal conditions: Ultrasonification intensity: 0.75 W/cm²; Time: 60 min; TS=23 g/L)

Parameters	Raw sludge	Ultrasonicated sludge
Total solids (TS) (g/L)	23 ±0.25	23 ±0.19
Volatile solids (VS) (g/L)	13.9±0.34	9.8±0.23
Suspended solids (SS) (g/L)	21.4±0.17	17.9±0.13
Volatile suspended solids (VSS) (g/L)	13±0.13	9±0.11
pH	5.7	5.7
Total chemical oxygen demand (TCOD) (g/L)	102080±244	102080±151
Soluble chemical oxygen demand (SCOD) (g/L)	39100±146	80500±146

Table 3 Results of screening experiments of the 2³⁻¹ FFD

Run	Ultrasonification parameters				Ultrasonicated sludge characteristics	
	Ultrasound intensity (W/cm ²)	Time (min)	TS (g/l)	Specific energy (kJ/kg)	SCOD increment (%)	TS reduction (%)
1	0.27	20	23	1 226.1	36.0	31.3
2	0.75	20	23	3 456.5	37.6	32.6
3	0.27	60	23	3 678.3	38.4	32.6
4	0.75	60	23	10 369.6	45.5	56 (12.88 g/L) ^{††}
5	0.27	20	44	6 40.9	30.9	34.8 (15.31 g/L) ^{††}
6	0.75	20	44	1 806.8	34.7	33.2
7	0.27	60	44	1 922.7	33.9	32.5
8	0.75	60	44	5 420.5	39.2	33.4
9 ^{†††}	0.51	40	33	3 234.5	35.8	35.8 (11.81 g/L) ^{††}
10 ^{†††}	0.51	40	33	3 234.5	35.9	34.8
11 ^{†††}	0.51	40	33	3 234.5	35.7	33.3
Control-1s [†]	-	-	23	-	-	27.4 (6.3 g/L) ^{††}
Control-2s [†]	-	-	33	-	-	27.9 (9.21 g/L) ^{††}
Control-3s [†]	-	-	44	-	-	26.1 (11.48 g/L) ^{††}

[†]Controls 1s, 2s, 3s refer to raw sludges at TS concentrations of 23, 33, and 44 g/L.

^{††}Values in parentheses correspond to the TS reduction calculated as g/L.

^{†††} Experimental numbers 9-11 are replicates.

Table 4 Results of SCOD increment and biodegradability of optimization experiments of CCD

Run	Factors in coded units			SCOD increment (%)	Biodegradability (%)
	X_1	X_2	X_3		
1	-1	-1	-1	28.6	36.00
2	1	-1	-1	25.5	33.33
3	-1	1	-1	22.1	30.00
4	1	1	-1	23.4	28.00
5	-1	-1	1	-2.3	35.65
6	1	-1	1	3.4	25.65
7	-1	1	1	-0.8	35.32
8	1	1	1	-0.4	29.03
9	-2	0	0	9.6	30.87
10	2	0	0	11.2	28.70
11	0	-2	0	10.8	30.87
12	0	2	0	12.5	22.61
13	0	0	-2	9.0	21.00
14	0	0	2	17.1	26.39
15	0	0	0	15.0	16.09
16	0	0	0	14.2	20.00
17	0	0	0	15.2	13.48
18	0	0	0	14.8	21.30
19	0	0	0	14.8	18.70
20	0	0	0	14.6	16.09
Control-1op	-	-	10		27.00
Control-2 op	-	-	15		26.30
Control-3 op	-	-	23		25.9
Control-4 op	-	-	31		25.6
Control-5 op	-	-	36		19.9

Controls from 1op to 5op refer to raw sludge at TS concentrations of 10, 15, 23, 31, and 36 g/L.

†Experimental numbers 15-20 are replicates.

Table 5 Effect of estimation and regression coefficient of the components of the model fitted to the data of CCD

Component	Effect estimation				Regression coefficient			
	SCOD increment		Biodegradability		SCOD increment		Biodegradability	
	Effect	<i>p</i>	Effect	<i>p</i>	Regression coefficient	<i>P</i>	Regression coefficient	<i>p</i>
Constant	0.7454	0.000	0.1739	0.0000	-0.2345	0.9163	5.9673	0.0001
X_1	0.0107	0.8001	-0.0372	0.0755	0.0573	0.4727	-0.1844	0.0004
X_1^2	- 0.0378	0.3950	0.1140	0.0001	-0.0008	0.395	0.0022	0.0002
X_2	- 0.0115	0.7805	-0.0323	0.1077	0.013	0.6972	-0.0581	0.0027
X_2^2	- 0.0247	0.5372	0.0782	0.0012	-0.0001	0.5372	0.0003	0.001
X_3	- 0.2534	0.0001	0.0106	0.5812	-0.0327	0.3899	-0.0212	0.2269
X_3^2	0.0034	0.9364	0.0639	0.0069	0.00003	0.9364	0.0005	0.0069
$X_1 * X_2$	- 0.0023	0.9659	0.0109	0.6590	-0.00002	0.9659	0.0001	0.659
$X_1 * X_3$	0.0198	0.7161	-0.0290	0.2549	0.0002	0.7162	-0.0003	0.2549
$X_2 * X_3$	0.0153	0.7784	0.0359	0.1655	0.0001	0.7785	0.0002	0.1655

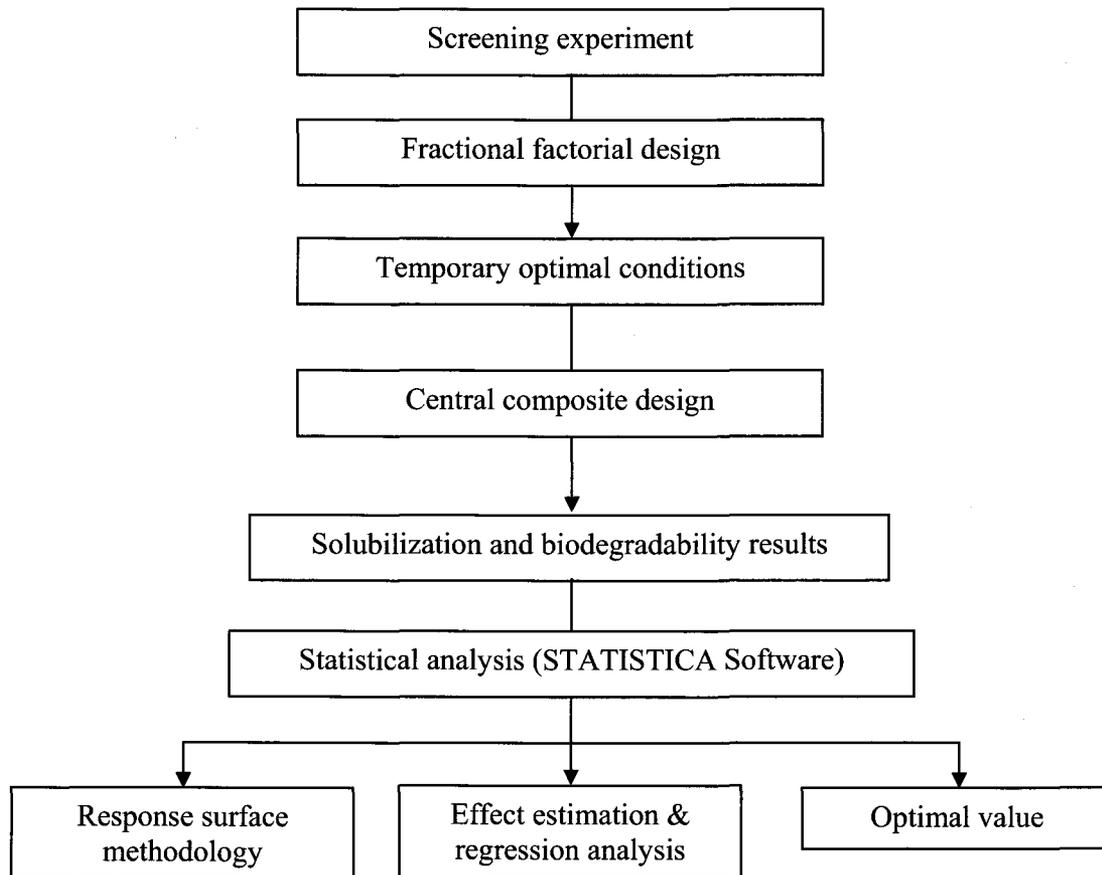


Figure 1 Schematic of optimization of ultrasonification process

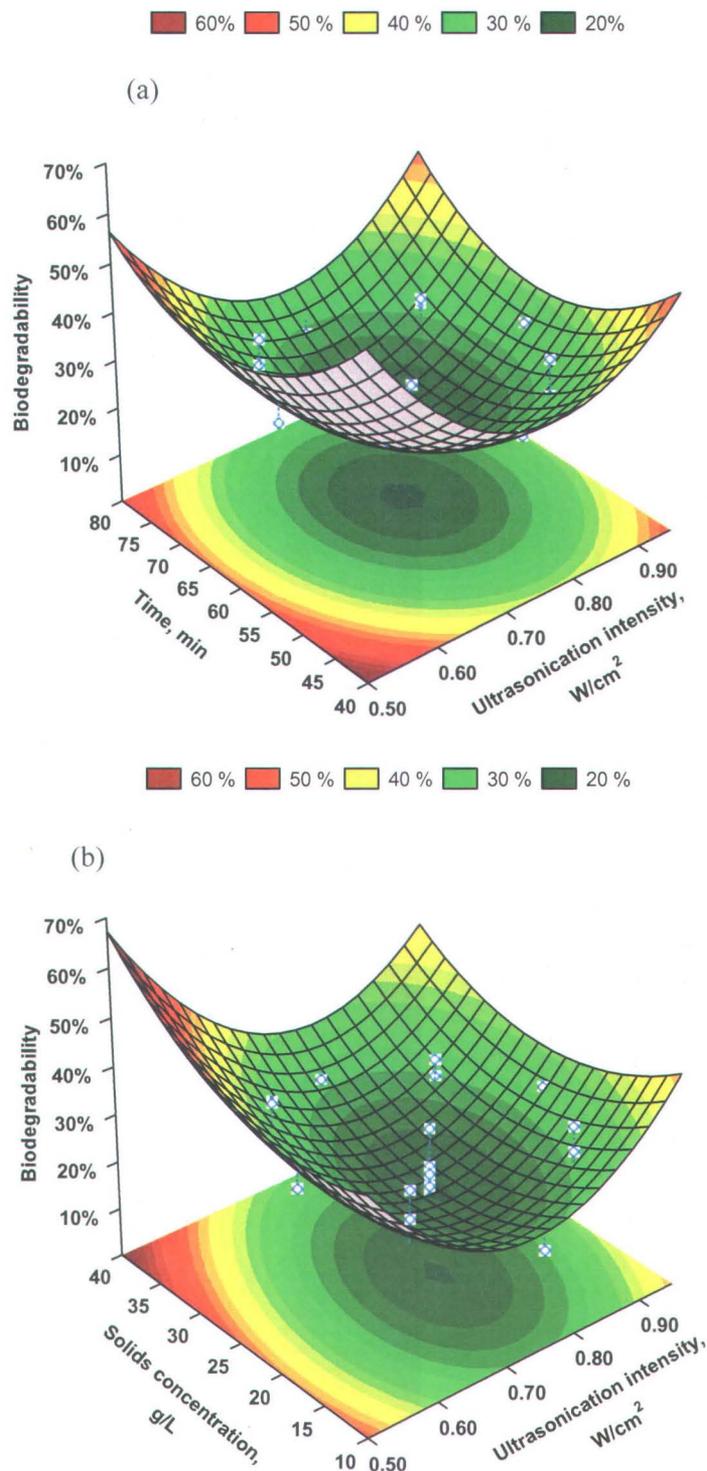


Figure 2 Response surface plots of biodegradability as a function of: (a) ultrasonication intensity and time (TS constant) and (b) ultrasonication intensity and solids concentration (time constant). Legends represent the biodegradability measured as percentage.

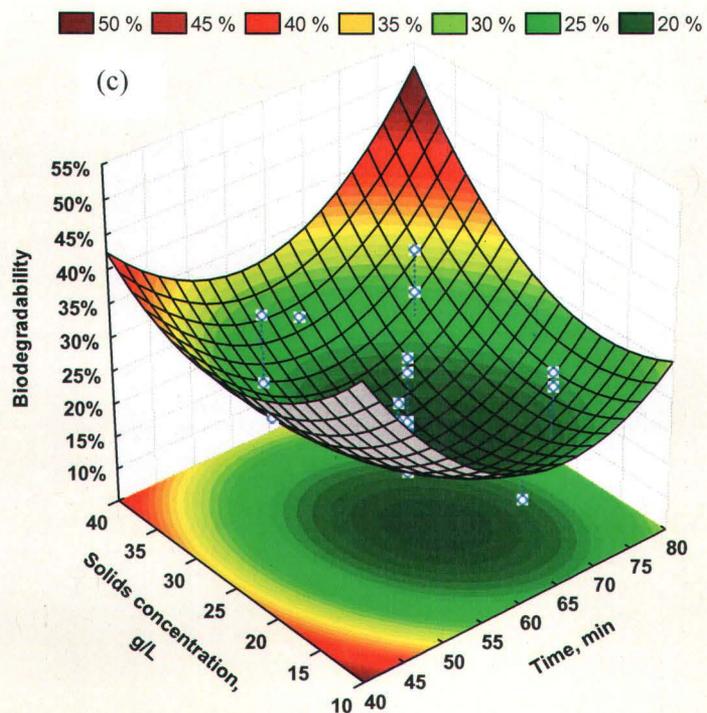


Figure 2 Response surface plots of biodegradability as a function of (c) time and solids concentration (ultrasonification intensity constant). Legends represent the biodegradability measured as percentage.

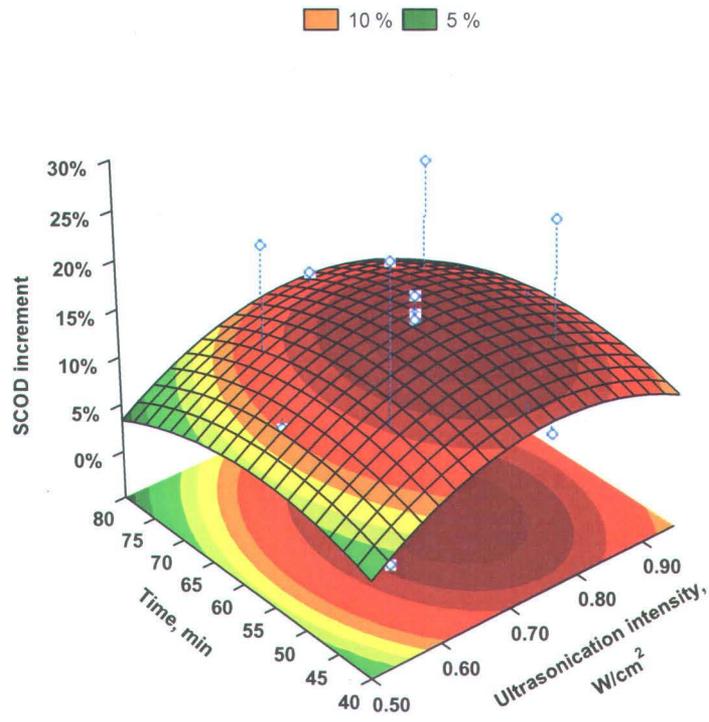


Figure 3 Response surface plot of solubilization as a function of ultrasonication intensity and time. Legends represent the SCOD increment measured as percentage.

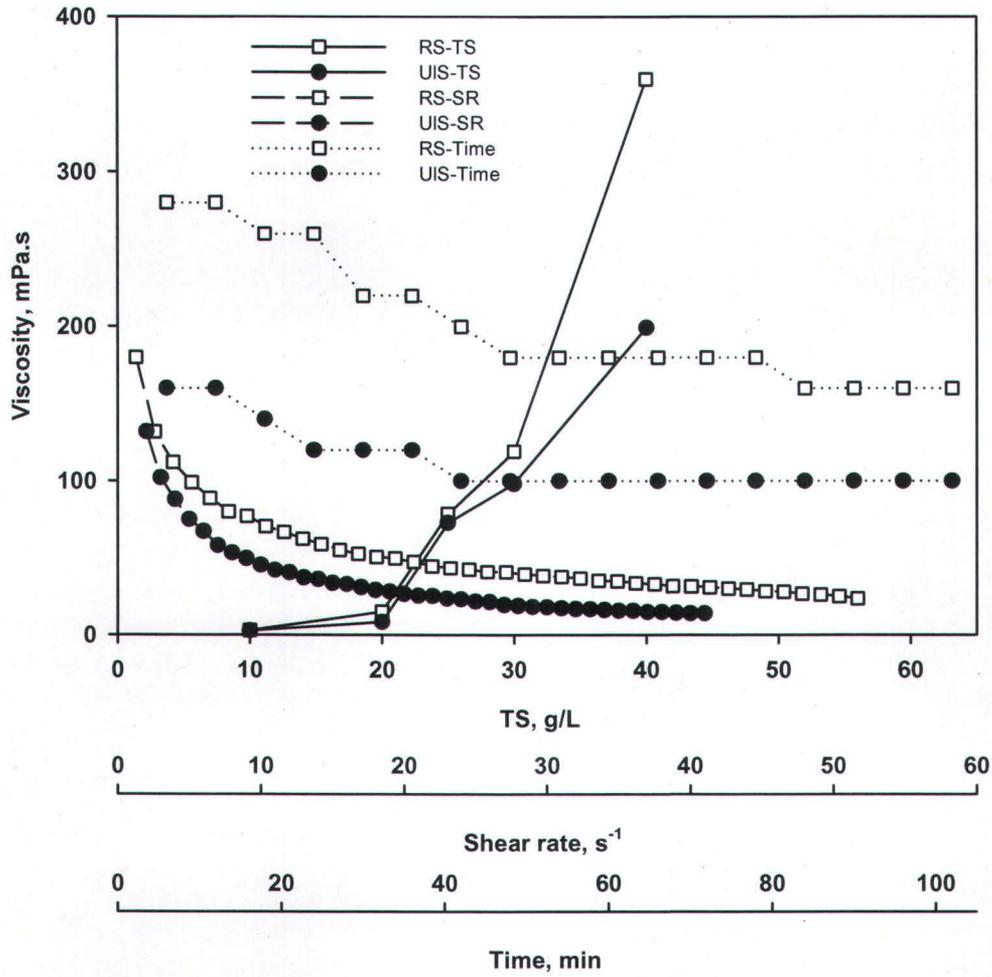


Figure 4 Viscosity evolution of raw and ultrasonicated sludge as a function of TS concentration, shear rate and time.

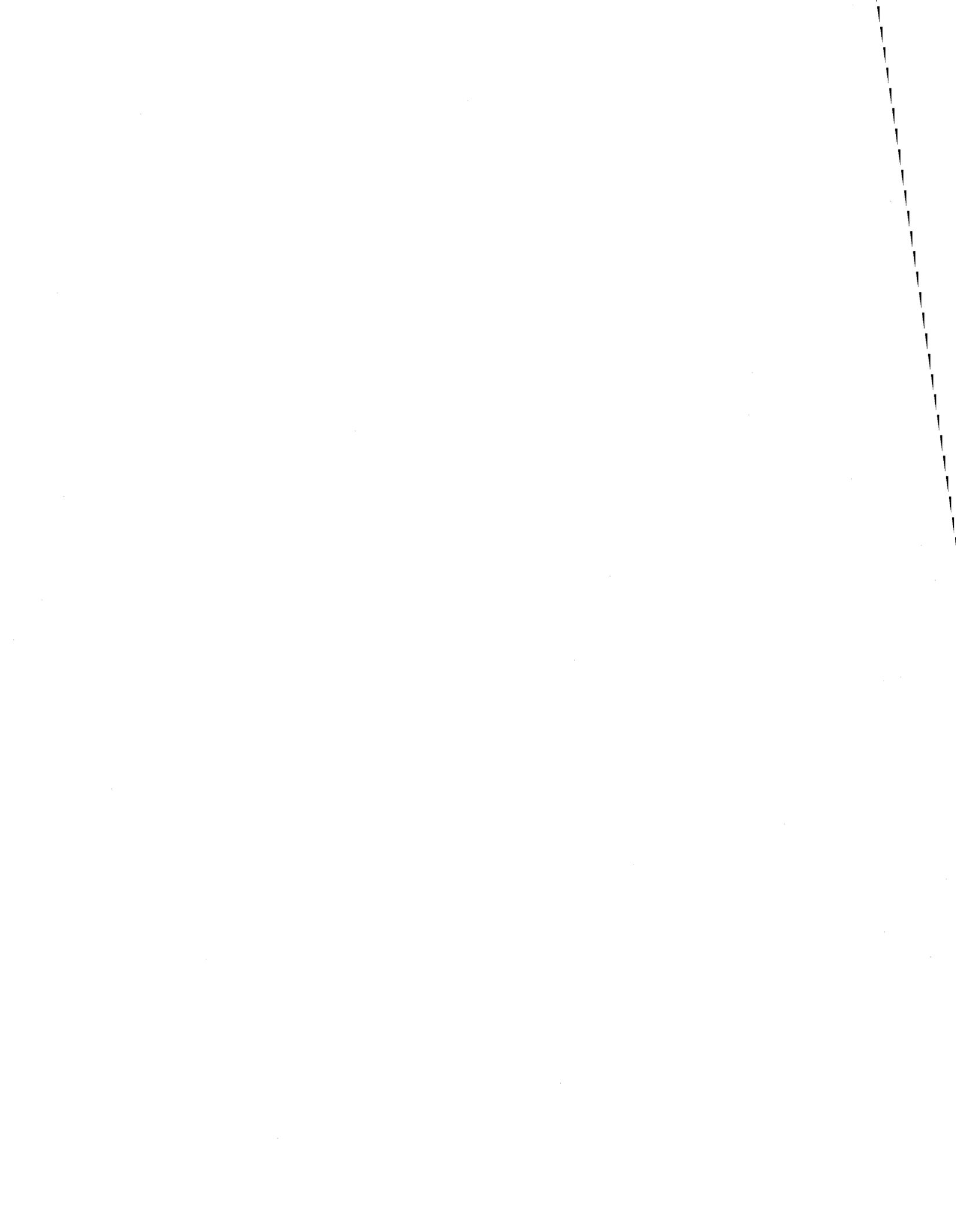
2.2. Optimization of Fenton oxidation pre-treatment for *B. thuringiensis* – based production of value added products from wastewater sludge

T. T. H. Pham^a, S. K. Brar^a, R. D. Tyagi^{a*} and R.Y. Surampalli^b

^aINRS-ETE, Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec (QC) G1K 9A9, Canada

^bUS Environmental Protection Agency, P.O. Box 17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

Journal of Environmental Management 91 (2010) 1657-1664



Résumé

Le prétraitement d'oxydation Fenton a été étudié pour l'amélioration de la biodégradabilité des boues d'épuration qui ont ensuite été utilisées comme substrat pour la production de produits à valeur ajoutée. La méthodologie de réponse en surface avec le plan factoriel fractionnaire et composite centré a été appliquée pour déterminer les effets des paramètres de l'oxydation Fenton sur la solubilisation et la biodégradabilité des boues et l'optimisation du processus Fenton. La plus forte solubilisation observée était de 81% à des conditions de 0,01 mLH₂O₂/g matière en suspension (MES), 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L solides totaux (ST), à 70°C et en 120 min. La plus haute biodégradabilité obtenue était de 74%. Elle a été obtenue dans des conditions similaires pour la concentration de H₂O₂, le rapport de [H₂O₂]₀-à-[Fe²⁺]₀, et la concentration en ST, mais à plus basse température (25°C) et sur une plus courte durée (60 min) par rapport aux conditions optimales de la solubilisation. En outre, ces conditions optimales ont été testées pour la production de produits à valeur ajoutée, le *Bacillus thuringiensis* (Bt) qui est utilisé comme biopesticide dans le secteur agricole et forestier. Il a été observé que la croissance Bt utilisant des boues traitées par l'oxydation Fenton comme substrat a été améliorée avec le nombre de cellules total maximum de 1,63 x 10⁹ UFC mL⁻¹ et la sporulation de 96% après 48h de fermentation. Les résultats ont également été testés contre un traitement par l'ultrasonification et le nombre total de cellules a été trouvé à 4,08 x 10⁸ UFC mL⁻¹ avec une sporulation de 90%. Ainsi, l'oxydation classique Fenton (traitement chimique) s'avère très prometteur pour la production de biopesticides de Bt à partir de boues d'épuration par rapport à l'ultrasonification (traitement physique).

Mots clés: *Bacillus thuringiensis*, biodégradabilité, boue d'épuration, méthodologie de réponse en surface, oxydation Fenton, ultrasonification.

Abstract

Fenton oxidation pretreatment was investigated for enhancement of biodegradability of wastewater sludge (WWS) which was subsequently used as substrate for the production of value-added products. Response surface method with fractional factorial and central composite designs was applied to determine the effects of Fenton parameters on solubilization and biodegradability of sludge and the optimization of Fenton process. Maximum solubilization and biodegradability was obtained as 70 and 74%, respectively at the optimal conditions: 0.01 mL H₂O₂/g SS, 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L TS, at 25°C and 60 min duration. Further, these optimal conditions were tested for the production of value added product, *Bacillus thuringiensis* (Bt) which is being used as a biopesticide in the agriculture and forestry sector. It was observed that Bt growth using Fenton oxidized sludge as a substrate was improved with maximum total cell count of 1.63 x 10⁹ CFU mL⁻¹ and 96% sporulation after 48 h of fermentation. The results were also tested against ultrasonification treatment and the total cell count was found to be 4.08 x 10⁸ CFU mL⁻¹ with a sporulation of 90%. Hence, classic Fenton oxidation was demonstrated to be rather more promising chemical pre-treatment for Bt - based biopesticide production using WWS when compared to ultrasonification as physical pre-treatment.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, biodegradability, Fenton oxidation, response surface methodology, ultrasonification, wastewater sludge.

1. Introduction

Wastewater sludge (WWS) primarily consists of biomass, so that biological processes are applied on WWS to obtain conventional value-added products (VAPs) including compost and biogas through composting and digestion (Zhou *et al.*, 2007). Specific VAPs, namely biopesticides, microbial inoculants, industrial enzymes and bacterial biopolymers have been produced from the bioconversion of WWS by employing monoculture technique using different microbial strains (Barnabé *et al.*, 2007).

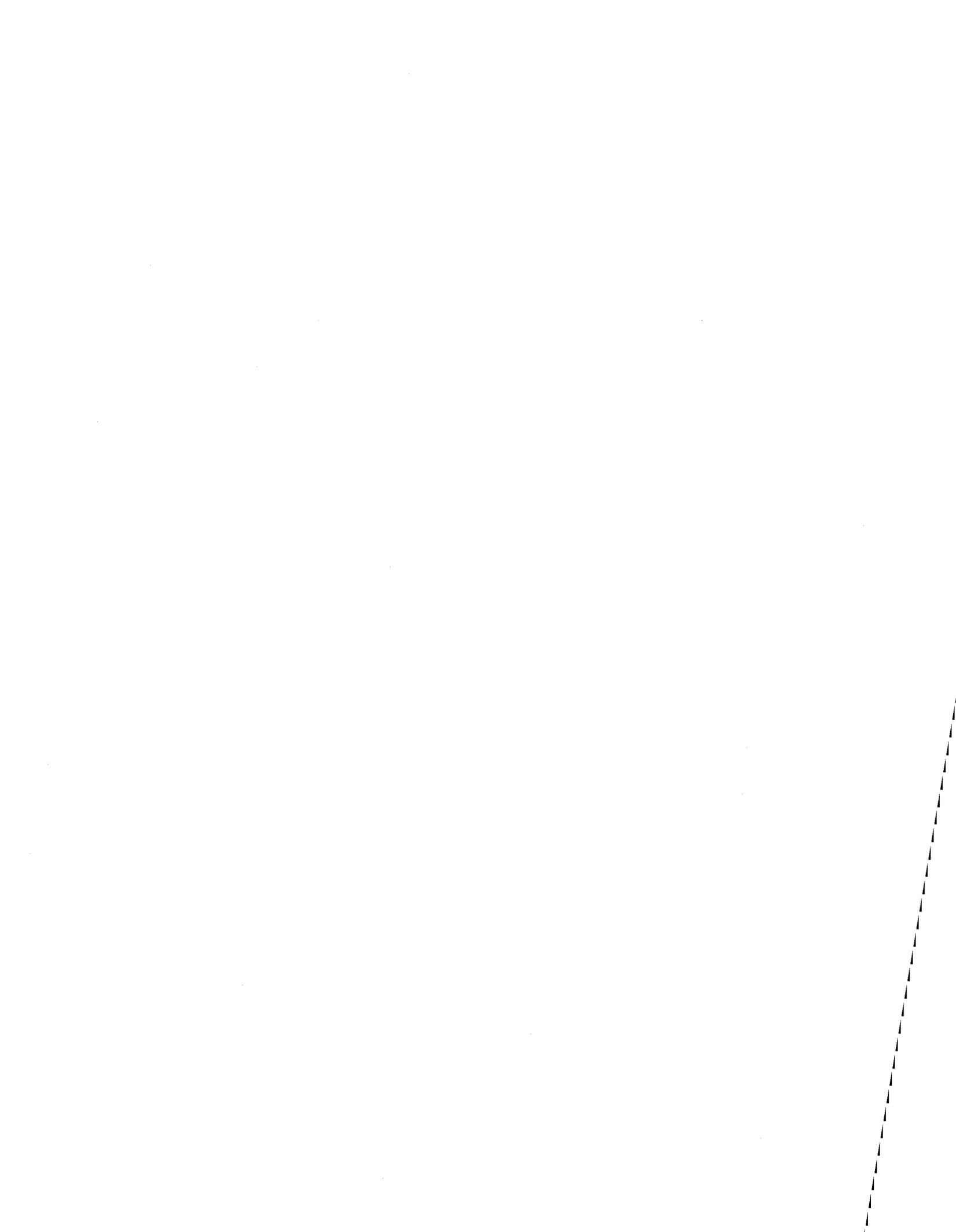
Although WWS is a rich source of carbon and nutrients for microbial growth during bioconversion, organic matter is not fully bioavailable, nor biodegradable (Aquino *et al.*, 2008). Hence, it is necessary to improve the access and susceptibility of sludge for VAP production by means of pre-treatment processes (Zhou *et al.*, 2007).

Ultrasonification has been reported as a prospective method in augmenting sludge biodegradability for sludge stabilization in several studies (Bougrier *et al.*, 2005; Dewil *et al.*, 2006; Pham *et al.*, 2009). The propagation of ultrasonic wave produces cavitation of gas and vapour bubbles, leading to induced physicochemical effects such as: (1) the promotion of chemical reactions as a result of a locally high temperature and pressure; (2) extreme shear forces in the liquid, thereby mechanically attacking components; (3) the formation of highly reactive radicals (H^{\bullet} and OH^{\bullet}), which can again facilitate chemical reactions to destroy organic contaminants (Bougrier *et al.*, 2005; Dewil *et al.*, 2006). Thus, ultrasonification pre-treatment enhanced the solubilization and biodegradability of WWS for subsequent biodegradation. In fact, our previous study on optimization of ultrasonification pretreatment for wastewater sludge (Pham *et al.*, 2009) demonstrated

improvement in sludge biodegradability thus defending the hypothesis of possible augmentation in the production capacity of VAPs.

Fenton oxidation is classified as an advanced oxidation process that is used as an effective pre-treatment to improve biodegradability and reduce toxicity of wastewater and wastewater sludge for further biological treatment (Andrews *et al.*, 2006; Comminellis *et al.*, 2008; Eskicioglu *et al.*, 2008). Fenton oxidation is capable of generating free hydroxyl radicals (OH^\bullet), a very powerful and non-selective oxidizing agent with an oxidation potential of 2.8 V. Fenton oxidation includes a range of reactions as follows: in an acidic aqueous solution, ferrous iron (Fe^{2+}) initiates and catalyses the decomposition of H_2O_2 , resulting in the generation of hydroxyl radicals, and then the hydroxyl radicals oxidize organics (RH) by abstraction of protons producing organic radicals (R^\bullet), which are highly reactive and can be further oxidized (Neyens et Baeyens, 2003; Primo *et al.*, 2008). The hydroxyl radicals pass easily through the microbial cell membrane in the sludge, leading to oxidative decomposition of the cell wall. As a result, organic substances are discharged from the microbial cell into the liquid phase. Moreover, the hydroxyl radicals oxidize the recalcitrant compounds in sludge into biodegradable ones that are further subject to biological treatment (Neyens *et al.*, 2004). Fenton oxidation was successfully applied to degrade leachate organics with the objective of improving its overall biodegradability (Hagman *et al.*, 2008; Primo *et al.*, 2008). Fenton oxidation was also employed for the enhancement of anaerobic digestibility as well as dewaterability of WWS (Neyens et Baeyens, 2003; Lo *et al.*, 2008; Tokumura *et al.*, 2009). Nonetheless, application of Fenton oxidation as pre-treatment for subsequent sludge – based VAP production has not been studied to date.

Hence, the objective of this study is to obtain optimal conditions of Fenton oxidation pre-treatment for improvement of sludge biodegradability. Further, a study was performed on production of VAPs, viz. *Bacillus thuringiensis* (Bt). Thus, Bt fermentation using non-pretreated and pre-treated sludges by Fenton oxidation and ultrasonification was performed to facilitate an evaluation of the effect of Fenton oxidation as a chemical process and ultrasonification as a physical one on value addition of wastewater sludge.



2. Materials and methods

2.1. Sludge

Secondary sludge used in the study was obtained from CUQ (Communauté urbaine de Québec, Canada) aerobic wastewater treatment facility. The sludge total solids (TS) was concentrated from 1.5 % (w/v) to higher TS concentrations by gravity settling for 24 hours. The supernatant was discarded; the particulates were diluted with demineralized water to obtain five concentrations (10, 20, 25, 30 and 40 TS g/L) and were homogenized in a Waring™ blender for 30 s. Maximum storage period of sludge was 1 week at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ to minimize microbial degradation.

2.2. Bacterial strain

Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-1 (ATCC 33679) (Bt) was used in this study. The Bt was subcultured and streaked on tryptic soya agar plates [TSA: 3.0% Tryptic Soya Broth (Difco) + 1.5% Bacto-Agar (Difco)], incubated for 24 hours at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and then preserved at 4°C for future use.

2.3. Fenton oxidation pre-treatment

Three hundred milliliters of each wastewater sludge sample at different solids concentrations were acidified to pH 3 with 10 N H_2SO_4 and placed in a 500 mL flask. H_2O_2 stock solution (30% v/v) and FeSO_4 stock solution (0.01 g/L) were added to the sludge samples to initiate the Fenton oxidation reaction. The volumes of stock solutions of the reagents added to the samples were calculated according to reagents' concentrations required for experiments (Table 1). Fenton oxidation was carried out in the flasks placed in a shaker at 150 rpm. The temperatures and time durations of Fenton reaction were controlled in the shaker according to temperatures and time durations required for experiments.

2.4. Ultrasonification pre-treatment

The ultrasonification was carried out using ultrasonic homogenizer Autotune 750W (Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, IL, USA). The ultrasonification equipment was operated at frequency of 20 kHz, using a platinum probe with tip diameter of 25 mm. Four hundred mL of wastewater sludge sample at ambient temperature was placed in a 1 L beaker. The ultrasonic probe was dipped in such a way that it was immersed 2 cm into the sludge. The ultrasonicated sludge was continuously used as substrate in Bt shake-flask fermentation to adjudge the feasibility of using physical treatment for biodegradability.

2.5. Biodegradability test

Examination of biodegradability was carried out by inoculating the Fenton oxidized sludges and raw sludges with microbial consortia of 2% (v/v) of fresh activated wastewater sludge followed by incubation of inoculated pre-treated sludge at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ at 150 rpm on a rotary shaker for 20 days. The biodegradability was assessed by the decrease in TS caused by consumption of microorganisms after incubation (20 days) (Eq 1). At the end of incubation, the volume loss due to evaporation was readjusted to 75 mL with Milli-Q water.

$$\text{Biodegradability} = \left(1 - \frac{\text{TS concentration after biodegradation}}{\text{TS concentration before biodegradation}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

2.6. Response surface methodology

In the response surface method, five parameters of Fenton oxidation pre-treatment, namely H_2O_2 concentration, ratio of initial concentration of H_2O_2 by initial concentration of Fe^{2+} , reaction time, reaction temperature, and solids concentration were treated as independent variables, and solubilization and biodegradability of pre-treated sludge as dependent variables. The screening experiments employing two-level fractional factorial design (FFD) were carried out to determine the direction of optimal domain for the two responses.

A set of 16 experiments and 6 replicates designed with all five independent variables was carried out. Once the provisional optimal values were determined, a central composite design (CCD) was used to verify the significance of impact of each factor on the response of solubilization and biodegradability. In the optimization step, three parameters of ratio of initial concentration of H₂O₂ to initial concentration of Fe²⁺, reaction time, and solids concentration were employed, whereas, H₂O₂ concentration and reaction temperature were fixed at optimal values obtained in screening experiments. The optimization step required 14 experiments and 6 replicates in all. The levels of each factor along with their codes and values of two experimental designs are listed in Table 1. After running the CCD experiments, a second-order polynomial regression equation was fit to the data (Eq. 2). Analysis of data by analysis of variance (ANOVA), regression analysis and the response surface methodology were performed with the statistical software of STATISTICA (version 6, Statsoft Inc., US).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1} \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

where, Y = predicted response of the dependent variable; X_i and X_j = independent variables influencing the response of Y; β₀ = constant of the second-order equation; β_i = linear regression coefficient of each independent variable; β_{ii} = quadratic regression coefficient of each independent variable; and β_{ij} = regression coefficient of interactions between two independent variables.

2.7. Bt shake-flask fermentation

A loopful of Btk from TSA plates was used to inoculate a 500-mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of sterilised TSY medium. The flask was incubated on a rotary shaker at 300 revolutions per min (rpm) and 30°C for 12 h. A 2% (v/v) inoculum from this flask was then used to inoculate 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of sterilized sludge media. These flasks were incubated for 12 h and used as a second inoculum. The

Erlenmeyer flasks (500 mL) containing 100 mL raw, ultrasonicated, and Fenton oxidized sludges were inoculated with 2.0% (v/v) second inoculum. The flasks were incubated at 300 rpm and $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h. Culture samples were withdrawn from the flasks at 3-hour interval to determine viable cells (VC) and viable spores (VS). The reliability was established by calculating the standard deviation of 10 independent samples drawn at the same time from shake-flask experiment. Standard deviation for total cell (TC) and viable spore (VS) count measurement was 6 -7%.

2.8. General analysis

Total solids (TS), suspended solids (SS), and chemical oxygen demand (COD) were determined by using Standard Methods (APHA, 2005). Chemical oxygen demand was measured in total sludge (TCOD) and in supernatant (SCOD) by centrifuging at 7650 g for 15 min at 4°C , followed by filtration of the sludge supernatant. Solubilization of sludge was determined by calculating the percentage of SCOD/TCOD.

3. Results and discussion

3.1. Effect of Fenton oxidation on solubilization and biodegradability of sludge

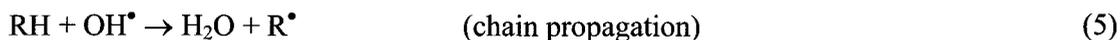
3.1.1. Screening experiments

The experimental design and the results of screening experiments of Fenton oxidation are presented in Table 2. Fenton experiments were carried out at pH 3 in which Fenton reaction was suggested to have its maximum catalytic activity, resulting in high reaction rate of OH[•] formation (Zang *et al.*, 2005; Bautista *et al.*, 2008). In the screening experiments, temporary optimal conditions of Fenton oxidation were determined at the experimental runs which gave the highest solubilization and biodegradability of sludge. The highest solubilization was 81% at conditions of 0.01 mL H₂O₂/gSS, 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L TS, at 70°C and in 120 min (run 11). Meanwhile, the highest biodegradability of 74% was obtained under similar conditions of H₂O₂ concentration, [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, and TS, but at a lower temperature of 25°C and in shorter time duration of 60 min (run 3) compared to the optimal conditions for solubilization. Fenton oxidation at high temperature and longer time duration involves acid hydrolysis of sludge, thus releasing more soluble matter from sludge, but probably not all the intermediate products are favourable for further aerobic biodegradation (Zhu and Chen, 2005).

In general, OH[•] was suggested to be generated as depicted in Equations 3 to 5 (Neyens and Baeyens, 2003)



Further, organic matter in sludge could be oxidized by OH[•] through an abstraction of proton producing organic radicals (R[•]), which are highly reactive and can be oxidized further (Eq 5). Difficult-to-degrade compounds present in sludge were transformed into easily degradable compounds via this mechanism.



H_2O_2 is the main reactant of OH^\bullet production (Eq 3), however residual H_2O_2 is not recommended as it transforms into OH^\bullet scavenger as depicted in Equations 6 to 8 (Neyens *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2008):



Additionally, H_2O_2 is a strong oxidant, and high concentration of H_2O_2 could cause complete oxidation of sludge into carbon dioxide and minerals (Cacho Rivero and Suidan, 2006). As a result, maximum solubilization and biodegradability were obtained at the lowest H_2O_2 concentration (0.01 mL/g SS) in the studied range. In addition, optimal solids concentration was also the lowest concentration (25 g/L) in the studied range. The amount of organic compounds in the sludge is one of the key factors in Fenton oxidation due to their role in scavenging OH^\bullet . The effect of the organic compounds on OH^\bullet concentration is to consume it and produce the organoradicals that participate in the redox mechanism of the iron species in the Fenton system (Yoon *et al.*, 2001). Moreover, during the biodegradation process, with certain microorganisms, and high concentration of organic matter due to high solids concentration may become inhibitory for microbial degradation (Vidarthi *et al.* (2002); Verma *et al.* (2007). On the other hand, higher the solids concentration, more viscous the sludge is, thus interfering with mass and oxygen transfer during degradation (Pham *et al.*, 2009a). The optimal $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ dosage in this study was 150, 1.5-fold higher than the one reported by Tokumura *et al.*, 2007 who studied the excess sludge from an activated sludge process with much lower TS (3 g/L). It was observed that the ratio of $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ -to- $[\text{Fe}^{2+}]_0$ played an important role in stoichiometric relations of Fenton reagents and organic substrate present in sludge (Yoon *et al.*, 2001).

The molar ratio of Fenton reagents must be optimized for each type of sludge, as well as each quantity and quality of sludge to be treated. Consequently, temporary optimal conditions of biodegradability were selected to carry out optimization experiments of Fenton oxidation.

3.1.2. Optimization experiments

Taking into account the selection of Fenton operational parameters for optimization, H_2O_2 concentration and temperature were retained at the provisional conditions, i.e., 0.01 mL/g SS and 25°C. Therefore, the central composite design of experiments was built with three factors, namely ratio of $[\text{H}_2\text{O}_2]_0$ -to- $[\text{Fe}^{2+}]_0$, TS and reaction time. The experimental design along with the results was presented in Table 3. The regression model in terms of second-order polynomial model was fit to the experimental data of solubilization and biodegradability. ANOVA analysis including the ratio of the level mean square (MS) and the residual MS followed a Fisher (F) distribution with degrees of freedom (df) as shown in Table 4. Firstly, the fitness of the model into solubilization and biodegradability data was evaluated based on correlation coefficients. As shown in Table 4, the fitted regression model explained 84% of variation in solubilization and 94% of variation in biodegradability. Additionally, F tests for lack of fit showed that the second-order response model appeared to adequately fit the data of both solubilization and biodegradability (p -values > 0.05). Except for the linear effect of $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$, all the main effects have MS higher than the residual MS so that most of the variation in the data of solubilization and biodegradability is accounted by the separate effects of independent variables. The statistical significance of individual and interaction effects were also determined based on comparison of F-value (F) with critical F-value (F_c) at 95, 99 and 99.9 % confidence levels. Taking into account the effect of Fenton operational parameters on sludge solubilization, $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$ showed no linear effect ($p > 0.05$), but showed a highly

significant quadratic effect ($F > F_c$ for $p < 0.01$); solids concentration has linear and quadratic significant effects ($F > F_c$ for $p < 0.05$); and reaction time had linear significant and highly significant quadratic effects ($F > F_c$ for $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Meanwhile, $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$ had a very highly significant quadratic effect on biodegradability ($F > F_c$ for $p < 0.001$) followed by highly significant linear and significant quadratic effects ($F > F_c$ for $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) at different solids concentration; and reaction time had very high quadratic effect ($F > F_c$ for $p < 0.001$). Evidently, combinations of parameters of Fenton process do not give any interaction effect on solubilization and biodegradability.

The second-order polynomial regression Equation (Eq 2) fitted well the experimental data to give the following models (Eqs 9 and 10) including regression coefficients with coded terms of Fenton operational parameters for solubilization and biodegradability response. The regression coefficients fitted into Equations 9 – 10 are those that are significant based on probability values ($p < 0.05$).

$$Y_{\text{solubilization}} = -169.5 - 0.001*X_1^2 - 0.032*X_2^2 + 5.609*X_3 - 0.047*X_3^2 \quad (9)$$

$$Y_{\text{biodegradability}} = 263.4 - 0.56*X_1 + 0.0019*X_1^2 - 1.7*X_2 + 0.0124*X_2^2 - 4.7*X_3 + 0.04*X_3^2 \quad (10)$$

Additionally, the response surface graphs presented the second-order polynomial model which showed the predicted response of two-parameter combination of Fenton process (change in two parameters, the rest values were fixed at central value). The solubilization response assessed as a function of Fenton's operational parameters is presented in Fig 1. While reaction time was fixed at 60 min, the highest solubilization of 40% was obtained in the range of 15 – 25 g/L TS and 120 – 180 $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$ (Fig 1a). The same response could be predicted in the range of 120 – 180 $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$ in 60 to 65 min of reaction time at 25 g/L TS (Fig. 1b). Keeping $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$ ratio to be 150, for the same reaction time, the predicted solubilization was 40% in the range of 13 – 28 g/L TS (Fig. 1c). The

response surface plots in Fig. 2 presented the predicted biodegradability by using three combinations of Fenton operational parameters. As shown in Fig. 2a, after 60 min of reaction time, maximum biodegradability was obtained to be 90% with decrease or increase in both $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$ and TS, or at condition of high $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$ and low TS. The biodegradability response could be predicted by the model nearing almost 100 % for the following conditions: at 25 g/L TS, increase in $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$ and shortening of reaction time (Fig 2b). Maximum response of 85% could be predicted while fixing $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$ at 150 and increase or decrease in the other parameters or by extension of the reaction time (Fig 2c).

It was suggested that three steps of organic matter degradation can occur from the beginning to the end of Fenton process as follows: primary degradation in which the parent compounds underwent physico-chemical transformation, thus improving biodegradability; acceptable degradation, meaning extent of degradation to reduce toxicity; and ultimate degradation, completely to carbon dioxide, water and other inorganics (Zang *et al.*, 2005). Moreover, TCOD reduction fluctuated from 2 – 5% in the overall experiments of this study (data unreported). Therefore, Fenton oxidation with the chosen parameters could be considered as partial oxidation (primary degradation) that played a vital role in the enhancement of solubilization and biodegradability of wastewater sludge. Accordingly, the choice of optimum parameters from screening experiments for Fenton pretreatment were supposed to be suitable for the sludge which was used in subsequent Bt fermentation.

3.2. Effect of pre-treatment processes on sludge-based Bt growth

Shake-flask fermentation of Bt using raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) as raw materials were carried out to test the effect of ultrasonification as physical pretreatment, and Fenton oxidation as chemical one, on production of value added products. The ultrasonicated and Fenton oxidized sludges were

pre-treated at optimum conditions of ultrasonification (i.e. 0.75 W/cm² ultrasonification intensity, 60 min ultrasonification time, 25 g/L TS) and Fenton process (i.e. 0.01 mL H₂O₂/g SS, 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L TS, at 25°C and 60 min). Evolution of viable cell and spore counts during fermentation of raw and pre-treated sludges as illustrated in Fig 3 showed different trends of Bt growth in three types of sludge. As shown in Fig 3a, the exponential phase of Bt in UIS and FS started at 3 h of time course and stayed until 21 h and 18 h, respectively. Meanwhile, the exponential growth in RS commenced later at 6 h until 21 h of fermentation. Later, slow growth in the three types of sludge persisted until 36 h, followed by declining phase observed at the end of fermentation process (48 h). Maximum total cell count observed at 30 h attained 1.44 x 10⁸, 4.08 x 10⁸, and 1.63 x 10⁹ CFU mL⁻¹ for RS, UIS and FS, respectively. The formation of spores in RS and FS started at 9 h, whereas the sporulation in UIS started later at 15 h during fermentation course (Fig 3b). At 48 h of fermentation, 96% of Bt cells in FS changed to spore, whereas in UIS and RS, there was only 90% and 84% of sporulation, respectively. Moreover, highest value of maximum specific growth rates (μ_m) of Bt was attained for FS (0.41 h⁻¹), followed by UIS (0.33 h⁻¹) and RS (0.32 h⁻¹). The results demonstrated the effect of pretreatment on stimulation of Bt growth and maximization of sporulation. Obviously, Fenton oxidation exhibited better improvement on Bt process performance compared to that of ultrasonification. This can be explained by considering the mechanisms of the two pre-treatment processes. Under hydromechanical shear forces generating during ultrasonification, sludge aggregates were disintegrated, followed by disruption of sludge cells, thus inducing the transformation of solid-state bound organic compounds into a soluble form (Pham *et al.*, 2009). This further resulted in augmentation of nutrient availability for subsequent Bt production in sludge. Meanwhile, Fenton oxidation not only enhanced sludge bioavailability by fragmentation of large organic

compounds into smaller ones, but also transformed organic recalcitrant compounds into easily biodegradable products due to the occurrence of OH^\bullet radicals (de Morais et Zamora, 2005). In particular, organic substances were partially oxidized by OH^\bullet making the sludge susceptible to utilization of by Bt microorganism. In addition, both pre-treatment processes caused considerable decrease in viscosity as well as in particle size that consequently ameliorated mass and oxygen transfer during Bt fermentation process (Pham *et al.*, 2010).

The enhancement of sludge-based Bt production was also reported for thermo-alkaline pretreatment process, but not for oxidative pretreatment using H_2O_2 as oxidant (Yezza *et al.*, 2005). The H_2O_2 concentration used in that study was two-fold than the one used in this study, leading to high mineralization of organic matter into CO_2 and water thus not augmenting Bt process performance as the organic matter becomes unavailable for fermentation (Yezza *et al.*, 2005).

Although Fenton pre-treatment was found to be favourable for augmentation of productivity of wastewater sludge-based Bt production, extensive experiments on Bt fermentation in large scale reactor are required for future work. Bt production carried out under controlled conditions of fermentation reactor (dissolved oxygen, pH, antifoam, impeller speed, aeration rate and temperature) would supposedly give higher productivity of the biopesticide. Additionally, after Fenton reaction, if the reagents, namely H_2O_2 and ferrous iron in the form of sulphate salt exist as residuals, they would not negatively affect Bt production due to following reasons: i) ferrous sulphate is required for Bt growth (Vidyarthia *et al.*, 2002), ii) at neutral pH (required pH for Bt growth), there is a decomposition of H_2O_2 into oxygen and water (Zang *et al.*, 2005; Bautista *et al.*, 2008). Thus, there will be no problem of addition of Fenton chemical reagents in sludge to be further used as a raw material for Bt production.



4. Conclusions

Present work on optimization of Fenton oxidation as pre-treatment for improvement of wastewater sludge-based value addition led to following conclusions:

1. Partial oxidation of WWS by Fenton enhanced solubilization and biodegradability for subsequent production of value added products.
2. Response surface methodology along with analysis of variance was an efficient method of showing the statistical significance of different parameters of Fenton oxidation as well as predicting the response of solubilization and biodegradability.
3. Optimal conditions of Fenton oxidation were 0.01 mL H₂O₂/g SS, 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L TS, at 25°C and 60 min. Under these conditions, solubilization and biodegradability of wastewater sludge were found to be, 70 and 74%, respectively.
4. Fenton oxidation pretreatment was demonstrated to be more efficient in enhancement of Bt growth using sludge as a medium when compared to ultrasonification pretreatment. Maximum total cell count of 1.63 x 10⁹ and 96% of sporulation of Bt growth was obtained in Fenton oxidized sludge.

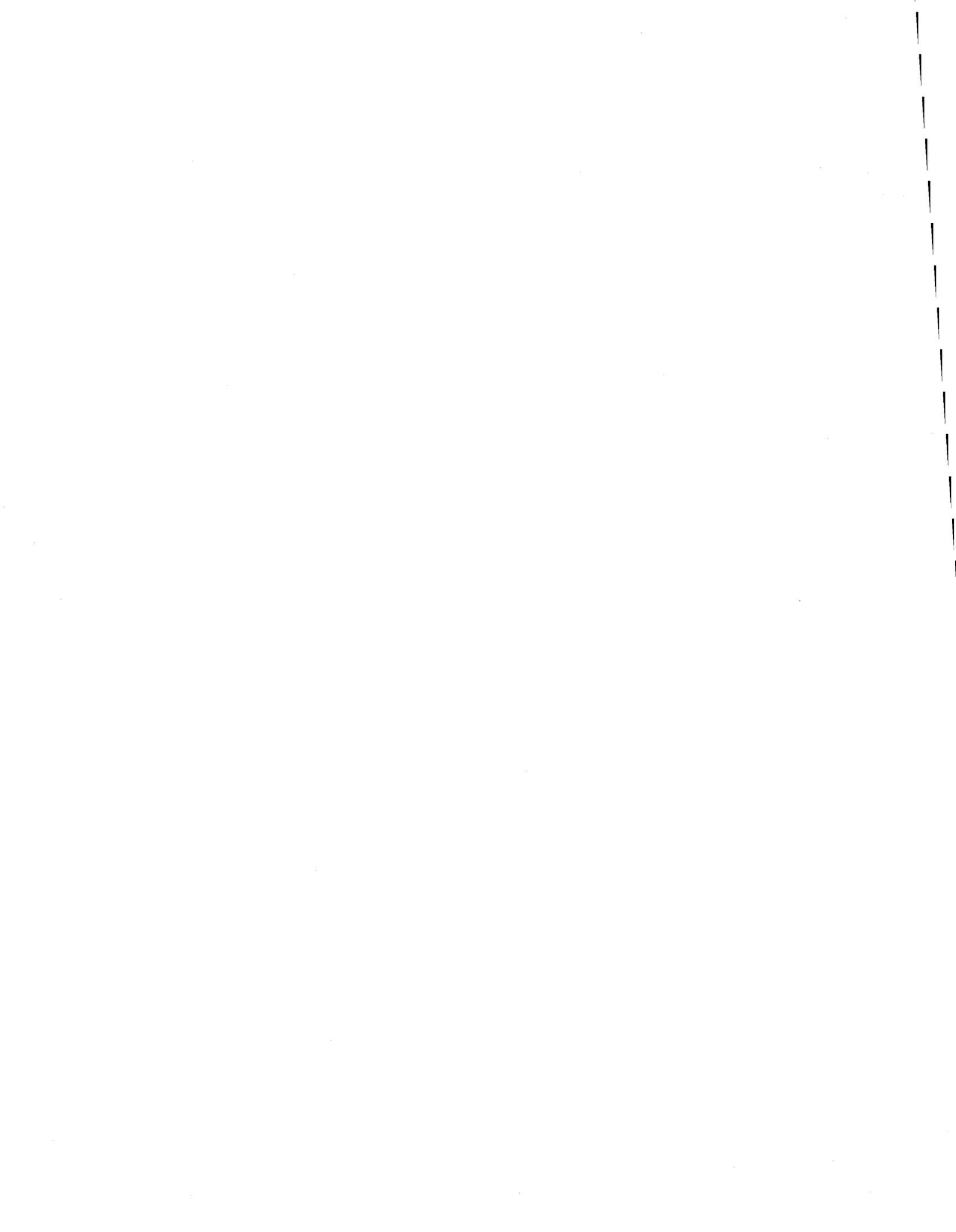


Acknowledgments

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grants A4984, STP235071, Canada Research Chair), NSERC (DG) and INRS-ETE for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors and should not be construed as opinions of the U.S. Environmental Protection Agency.

Appendix

<i>Abbreviations</i>	
ANOVA	Analysis of variance
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
F	Fisher
FS	fenton oxidized sludge
MS	mean square
RS	raw sludge
SCOD	soluble chemical oxygen demand (mg/l)
TCOD	total chemical oxygen demand (mg/l)
TS	Total solid (g/L)
UIS	ultrasonicated sludge
WWS	wastewater sludge



References

- Andrews, J.P., Asaadi, M., Clarke, B., Ouki, S., 2006. Potentially toxic element release by Fenton oxidation of sewage sludge. *Water Science & Technology* 54 (5), 197-205.
- APHA, AWWA and WEF, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Edition.
- Aquino, S.F., Chernicharo, C.A.L., Soares, H., Takemoto, S.Y., Vazoller, R.F., 2008. Methodologies for determining the bioavailability and biodegradability of sludges. *Environmental Technology* 29, 855-862.
- Barnabé, S., Yan, S., Tyagi, R.D., 2007. Fate of toxic organic compounds during bioconversion of wastewater sludge to value added products. Proceedings of IWA conference on Moving Forward: Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial, and Public Synergy. New Brunswick, Canada.
- Bautista, P., Mohedano, A.F., Casas, J.A., Zazo, J.A., Rodriguez, J.J, 2008. An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83, 1323-1338.
- Benatti, C.T., Tavares, C.R.G., Guedes, T.A., 2006. Optimization of Fenton's oxidation of chemical laboratory wastewaters using the response surface methodology. *Journal of Environmental Management* 80, 66-74.
- Bourgrier C., Carrère H. and Delgenès J.P. (2005). Solubilization of waste-activated sludge by ultrasonic treatment. *Chemical Engineering Journal* 106, 163-169.
- Cacho Rivero, J.A., Suidan, M.T., 2006. Effect of H₂O₂ dose on the thermo-oxidative co-treatment with anaerobic digestion of excess municipal sludge. *Water Science & Technology* 54 (2), 253-259.

- Comninellis, C., Kapalka, A., Malato, S., Parsons, S.A., Poulios, I., Mantzavinos, D., 2008. Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83, 769-776.
- Dewil R., Baeyens J., Goutvrind R. (2006). Ultrasonic Treatment of Waste Activated Sludge. *Environmental Progress* 25 (2): 121-128.
- Eskicioglu, C., Prorob, A., Marinc, J., Droste, R.L., Kennedy, K.J., 2008. Synergetic pretreatment of sewage sludge by microwave irradiation in presence of H₂O₂ for enhanced anaerobic digestion. *Water Research* 42, 4674-4682.
- Hagman, M., Heander, E., Jansen, J. la C., 2008. Advanced oxidation of refractory organics leachate - potential methods and evaluation of biodegradability of the remaining substrate. *Environmental Technology* 29, 941-946.
- Lo, K.V., Liao, P.H., Yin, G.Q., 2008. Sewage sludge treatment using microwave-enhanced advanced oxidation processes with and without ferrous sulfate addition, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83, 1370-1374.
- Morais, J.L. de, Zamora, P.P., 2005. Use of advanced oxidation processes to improve the biodegradability of mature landfill leachates. *Journal of Hazardous Materials B123*, 181-186.
- Neyens, E., Baeyens, J., 2003. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials B98*, 33-50.
- Neyens, E., Baeyens, J., Dewil, R., De heyder, B., 2004. Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering. *Journal of Hazardous Materials 106B*, 83-92.
- Pham, T.T.H., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2009. Ultrasonification of wastewater sludge - Consequences on biodegradability and flowability. *Journal of Hazardous Materials 163*, 891-898.

- Pham, T.T.H., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Influence of ultrasonification and Fenton oxidation pre-treatment on rheological characteristics of wastewater sludge. *Ultrasonics Sonochemistry* 17, 38-45.
- Primo, O., Rueda, A., Rivero, M.J., Ortiz, I., 2008. An Integrated Process, Fenton Reaction - Ultrafiltration, for the Treatment of Landfill Leachate: Pilot Plant Operation and Analysis, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47, 946-952.
- Tokumura, M., Katoh, H., Katoh, T., Znad, H.T., Kawase, Y., 2009. Solubilization of excess sludge in activated sludge process using the solar photo-Fenton reaction. *Journal of Hazardous Materials* 162, 1390–1396.
- Tokumura, M., Sekine, M., Yoshinari, M., Znad, H.T., Kawase, Y., 2007. Photo -Fenton process for excess sludge disintegration. *Process Biochemistry* 42, 627-633.
- Verma M., Brar S.K., Riopel A.R., Tyagi R.D., Surampalli R.Y.. Pre-treatment of wastewater sludge biodegradability and rheology study, *Environmental Technology* 28 (2007) 273-284.
- Vidyarthia, A.S., Tyagi, R.D., Valéro, J.R., Surampalli, R.Y., 2002. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. *Water Research* 36, 4850-4860.
- Yezza, A., Tyagi, R. D., Valéro, J.R., Surampalli R. Y., 2005. Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21, 1165–1174.
- Yoon, J., Lee, Y., Kim, S., 2001. Investigation of the reaction pathway of OH radicals produced by Fenton oxidation in the conditions of wastewater treatment, *Water Science & Technology* 44 (5), 15–21.
- Zhang, H., Choi, H.J., Huang, C.-P., 2005. Optimization of Fenton process for the treatment of landfill leachate. *Journal of Hazardous Materials B* 125, 166-174.

Zhou, J., Parker, W., Laha, S., 2007. Biosolids and Sludge Management, *Water Environment Research* 79(10), 1496-1527.

Zhu, H., Chen, J., 2005. Study of hydrolysis and acidification process to minimize excess biomass production. *Journal of Hazardous Materials B127*, 221-227.

Table 6 Codes and values of independent variables of different levels of 2^{5-1} FFD and 2^3 CCD

Factor	Symbol	Experimental design	Level				
			-2	-1	0	1	2
[H ₂ O ₂] (mL H ₂ O ₂ /g SS)		FFD		0.01	0.03	0.05	
[H ₂ O ₂] ₀ /[Fe ²⁺] ₀		FFD		50	100	150	
	X_1	CCD	66	100	150	200	234
TS (g/L)		FFD		25	34	44	
	X_2	CCD	8	15	25	35	42
Time (min)		FFD		60	90	120	
	X_3	CCD	43	50	60	70	77
Temperature (°C)		FFD		60	90	120	

FFD referred to as fractional factorial design

CCD referred to as central composite design

Table 7. Solubilization and biodegradability of FFD- screening experiments

Run	Parameters					Results	
	[H ₂ O ₂] (mL/g SS)	[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	TS (g/L)	Temp. (°C)	Time (min)	Solubilization (%)	Biodegradability (%)
1	0.01	50	25	25	120	74	64
2	0.05	50	25	25	60	69	64
3	0.01	150	25	25	60	70	74
4	0.05	150	25	25	120	69	66
5	0.01	50	44	25	60	60	65
6	0.05	50	44	25	120	59	64
7	0.01	150	44	25	120	61	68
8	0.05	150	44	25	60	61	67
9	0.01	50	25	75	60	77	68
10	0.05	50	25	75	120	69	68
11	0.01	150	25	75	120	81	63
12	0.05	150	25	75	60	68	63
13	0.01	50	44	75	120	62	68
14	0.05	50	44	75	60	57	67
15	0.01	150	44	75	60	56	68
16	0.05	150	44	75	120	57	67
17	0.03	100	34	50	90	64	62
18	0.03	100	34	50	90	68	62
19	0.03	100	34	50	90	64	61
20	0.03	100	34	50	90	63	63
21	0.03	100	34	50	90	67	61
22	0.03	100	34	50	90	65	62
RS-1	-	-	25	-	-	62	52
RS-2	-	-	34	-	-	57	54
RS-3	-	-	44	-	-	53	53

FFD referred to as fractional factorial design

Table 8. Solubilization and biodegradability of CCD- experiments

Run	Parameters			Results	
	[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	TS (g/L)	Time (min)	Solubilization (%)	Biodegradability (%)
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	100	15	50	37	71
2	200	15	50	29	73
3	100	35	50	33	64
4	200	35	50	28	67
5	100	15	70	38	73
6	200	15	70	43	71
7	100	35	70	41	67
8	200	35	70	33	72
9	66	25	60	38	73
10	234	25	60	39	79
11	150	8	60	48	69
12	150	42	60	29	63
13	150	25	43	30	72
14	150	25	77	38	75
15	150	25	60	35	62
16	150	25	60	48	61
17	150	25	60	50	62
18	150	25	60	50	62
19	150	25	60	43	60
20	150	25	60	48	59
RS-1	-	8	-	43	49
RS-2	-	15	-	35	53
RS-3	-	25	-	30	55
RS-4	-	35	-	38	46
RS-5	-	42	-	30	47

CCD referred to as central composite design

Table 9 Analysis of variance

Effect	Solubilization					Biodegradability				
	SS	df	MS	F	<i>p</i>	SS	df	MS	F	<i>p</i>
[H ₂ O ₂] ₀ /[Fe ²⁺] ₀ (L)	15	1	15	0.95	0.353	20.9	1	20.9	5.7	0.038
[H ₂ O ₂] ₀ /[Fe ²⁺] ₀ (Q)	167	1	167	10.5	0.009	319	1	319	87	0.000003
TS (L)	147.8	1	147.7	9.3	0.012	52	1	52	14	0.004
TS (Q)	148.3	1	148.3	9.4	0.012	23.1	1	23.1	6.3	0.031
Time (L)	131	1	131	8.3	0.017	9.2	1	9.2	2.5	0.144
Time (Q)	328.4	1	328.4	20.7	0.001	219.7	1	219.7	59.9	0.000016
[H ₂ O ₂] ₀ /[Fe ²⁺] ₀ -TS	14	1	14	0.89	0.369	7.2	1	7.2	2	0.191
[H ₂ O ₂] ₀ /[Fe ²⁺] ₀ -Time	13	1	13	0.8	0.386	0.5	1	0.5	0.1	0.72
TS - Time	0.3	1	0.3	0.02	0.890	8	1	8	2.2	0.17
Residual	158.6	10	15.9			36.7	10	3.7		
Lack of fit	115	5	23	2.6	0.155	29	5	5.9	4	0.077
Pure error	43	5	8.7			7	5	1.5		
Total	1017.3	19				626.3	19			
<i>R</i> ²	0.84					0.94				

SS, MS, df, F, *p* as shorthands of Sum of Square, Mean square, degrees of freedom, Fisher distribution, and probability, respectively.

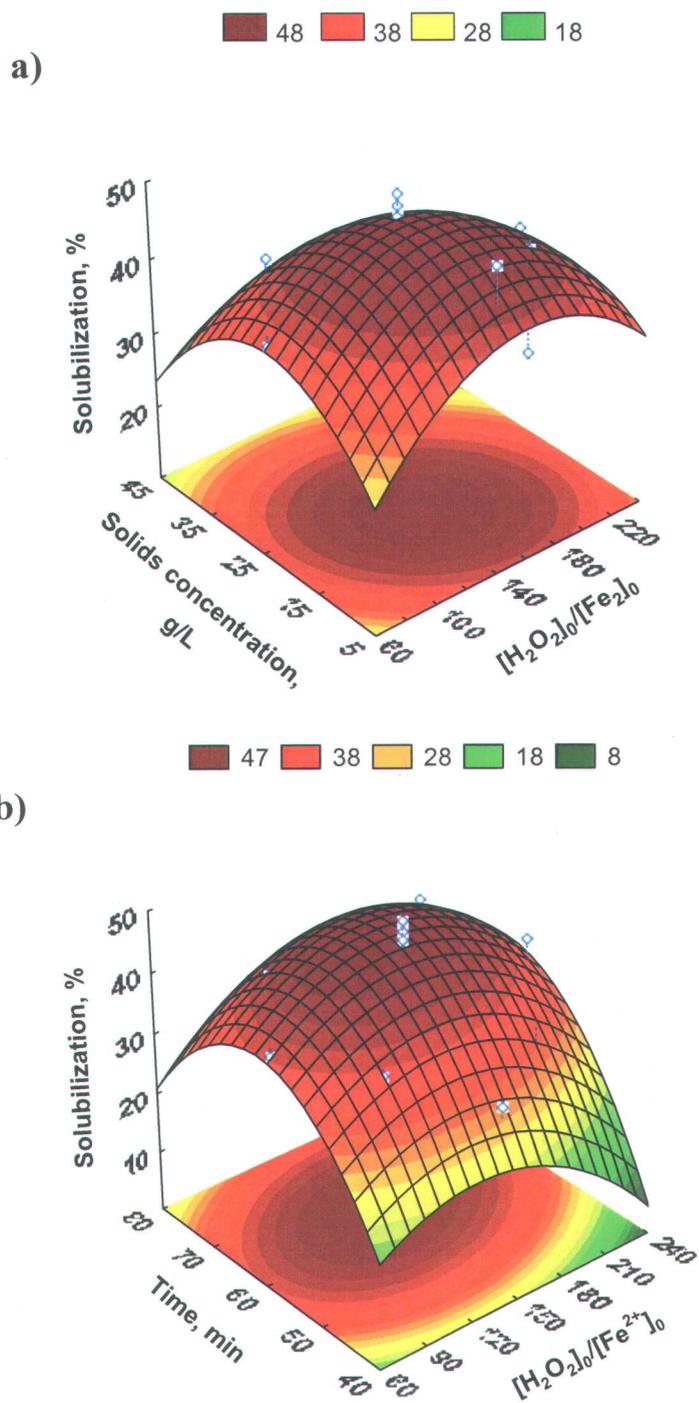


Figure 5 Response surface plots for solubilization as a function of: (a) Total solids and $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; (b) Time and $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; and (c) Time and total solids.

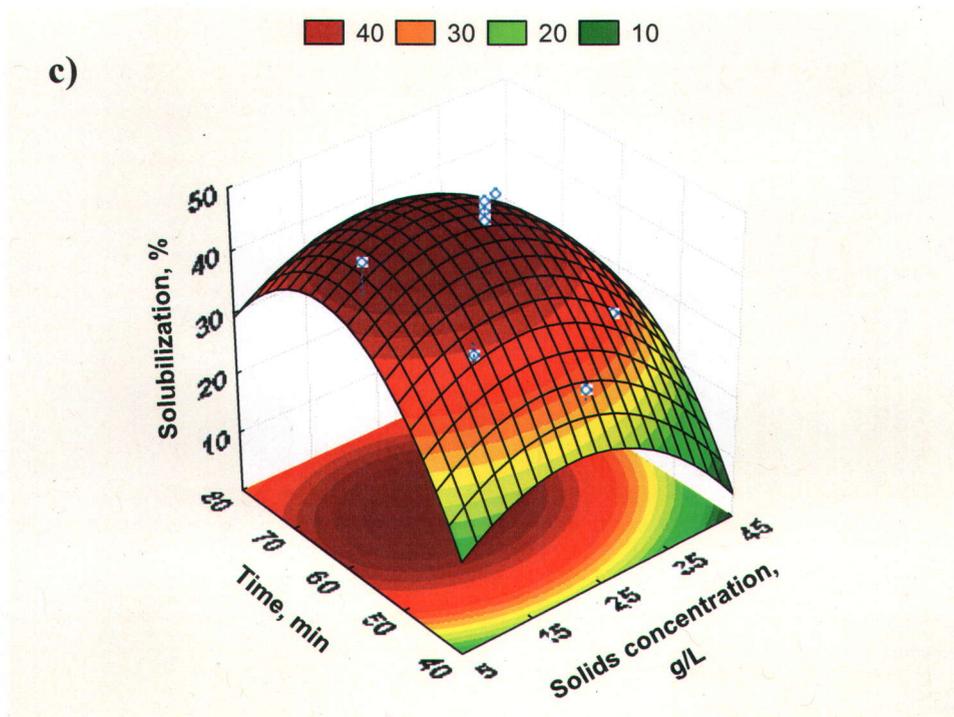


Figure 5 Response surface plots for solubilization as a function of: (a) Total solids and $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$; (b) Time and $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$; and (c) Time and total solids.

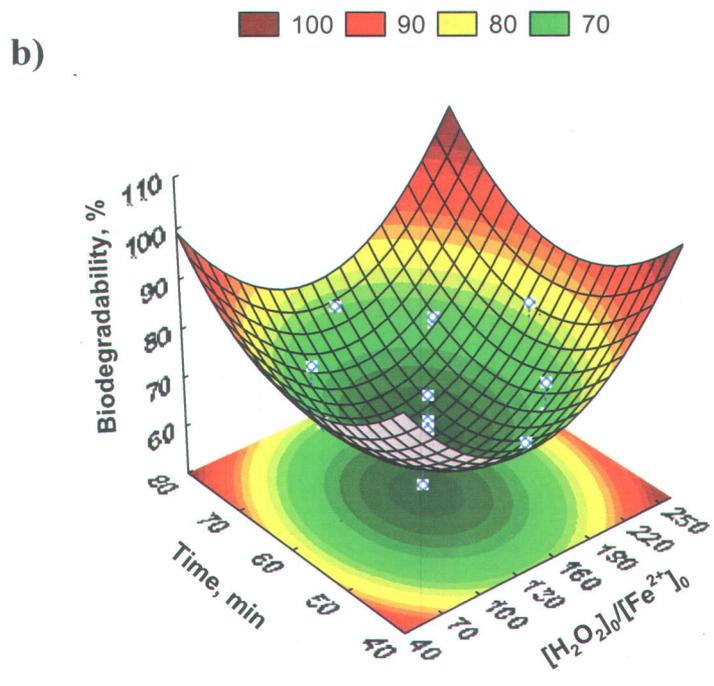
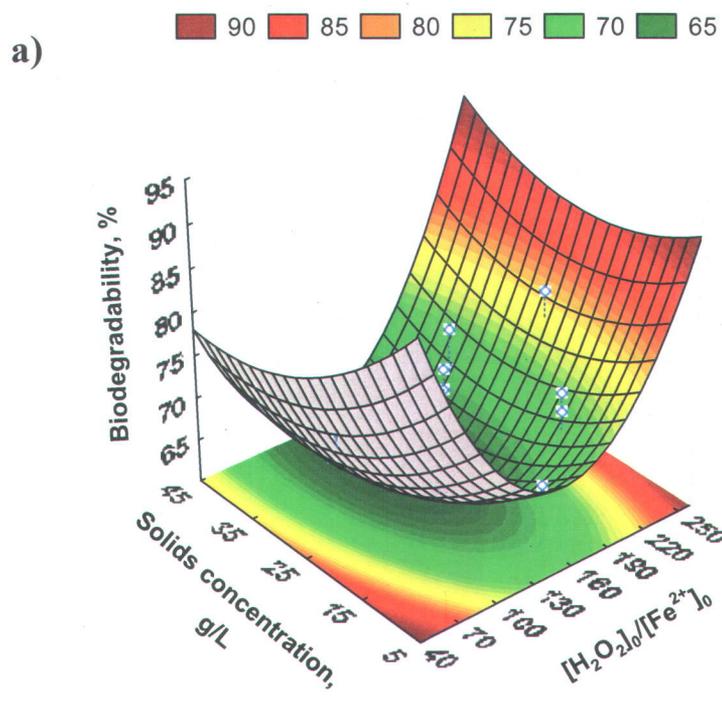


Figure 6 Response surface plots for biodegradability as a function of: (a) Total solids and $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; (b) Time and $[H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; and (c) Time and total solids.

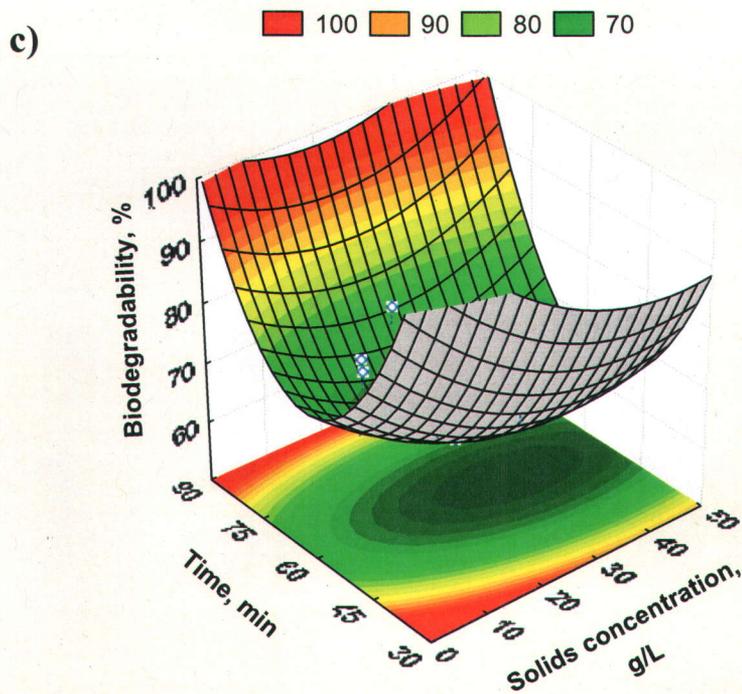


Figure 6 Response surface plots for biodegradability as a function of: (a) Total solids and $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$; (b) Time and $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0$; and (c) Time and total solids.

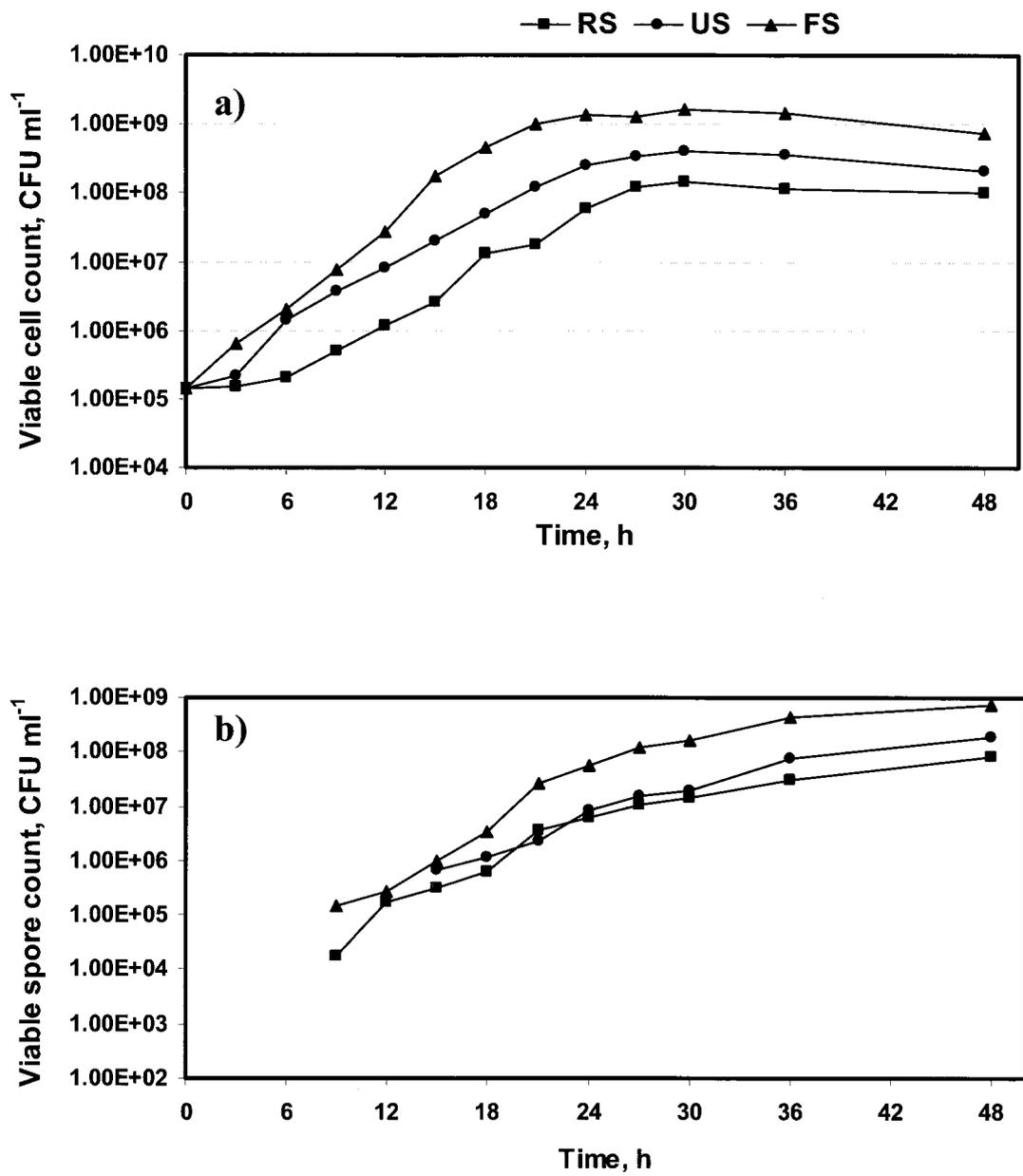


Figure 7 Variation of (a) viable cell and; (b) spore count during *Bacillus thuringiensis* growth in raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges.

**CHAPITRE 3 EFFET DE PRÉTRAITEMENT SUR LES CARACTÈRES
RHÉOLOGIQUES DES BOUES D'ÉPURATION**
(Résultats de l'objectif 4)

**3.1. Influence of ultrasonification and Fenton oxidation pre-treatment on
rheological characteristics of wastewater sludge**

T. T. H. Pham^a, S. K. Brar^a, R. D. Tyagi^{a*} and R. Y. Surampalli^b

^aINRS-ETE, Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec (QC) G1K 9A9, Canada

^bUS Environmental Protection Agency, P.O. Box 17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

Ultrasonics Sonochemistry 17 (2010), 38-45

Résumé

Les propriétés rhéologiques de la boue non traitée et des boues traitées par l'ultrasonification et l'oxydation Fenton ont été étudiées à l'aide d'un viscosimètre rotatoire Brookefield DVII PRO + équipé d'un logiciel Rheocalc32. Les boues ont été traitées dans des conditions optimales de l'ultrasonification et l'oxydation Fenton. Les boues non traitées et traitées avaient un comportement non newtonien avec rhéofluidification ainsi que des propriétés thixotropiques pour les concentrations en ST allant de 10 g/L à 40 g/L. Les modèles rhéologiques, soit ceux de « Bingham plastic », « Casson law », « NCA/CMA Casson », « IPC Paste » et « Power law » ont également été étudiés pour caractériser l'écoulement des boues. Parmi les modèles rhéologiques, le « Power law » était le plus important pour caractériser la rhéologie des boues. Les prétraitements ont entraîné une diminution de la pseudoplasticité des boues en raison de la baisse de l'indice de consistance K variant de 42,4 à 1188, de 25,6 à 620,4 et 52,5 à 317,9. Ils ont entraîné aussi une augmentation de l'indice d'écoulement n changeant les comportements de 0,5 à 0,35, de 0,62 à 0,55 et de 0,63 à 0,58, respectivement pour boues non traitée et boues traitées par l'ultrasonification et l'oxydation Fenton aux concentrations en solides totaux (ST) de 10 - 40 g/L. Les corrélations entre l'amélioration de la biodégradabilité et de la déshydratation, la diminution de la viscosité, et le changement de la taille des particules des boues en fonction du prétraitement ont également été étudiées. L'oxydation Fenton a facilité la filtrabilité des boues, résultant en une valeur du temps de succion capillaire de 50% pour les boues non traitées. Dans le cas de l'ultrasonification, l'énergie d'entrée élevée a détérioré la filtrabilité. La biodégradabilité a également été améliorée par les processus de prétraitement, et la valeur maximale a été obtenue de 64%, 77% et 73%, respectivement pour les boues non traitées et traitées par l'ultrasonification et l'oxydation Fenton à une concentration en ST de 25 g/L. Ainsi, le prétraitement a modifié des propriétés rhéologiques des boues d'épuration afin que: 1) l'écoulement des boues a été amélioré pour le transport à travers la chaîne de traitement (par des tuyaux et des pompes); 2) La déshydratation des boues d'épuration a été améliorée pour l'élimination ultime et; 3) l'assimilation des nutriments par les microorganismes pour la production des produits à valeur ajoutée des boues a été augmentée.

Mots clés: Biodégradabilité, boue d'épuration, filterabilité, oxidation Fenton, rhéologie, taille de particule, rheology, ultrasonification.

Abstract

The effect of ultrasonification and Fenton oxidation as physico-chemical pre-treatment processes on the change of rheology of wastewater sludge was investigated in this study. Pre-treated and raw sludges displayed non-Newtonian rheological behaviour with shear thinning as well as thixotropic properties for total solids ranging from 10 to 40 g/L. The rheological models, namely, Bingham plastic, Casson law, NCA/CMA Casson, IPC Paste, and Power law were also studied to characterize flow of raw and pre-treated sludges. Among all rheological models, the Power law was more prominent in describing the rheology of the sludges. Pre-treatment processes resulted in a decrease in pseudoplasticity of sludge due to the decrease in consistency index K varying from 42.4 to 1188, 25.6 to 620.4 and 52.5 to 317.9; and increase in flow behaviour index n changing from 0.5 to 0.35, 0.62 to 0.55 and 0.63 to 0.58, for RS, UIS and FS, respectively, at solids concentration 10 - 40 g/L. The correlation between improvement of biodegradability and dewaterability, decrease in viscosity, and change in particle size as a function of sludge pre-treatment process was also investigated. Fenton oxidation facilitated sludge filterability resulting in capillary suction time values which were approximately 50% of the raw sludges, whereas ultrasonification with high input energy deteriorated the filterability. Biodegradability was also enhanced by the pre-treatment processes, and the maximum value was obtained (64, 77 and 73% for raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges, respectively) at total solids concentration of 25 g/L. Hence, pre-treatment of wastewater sludge modified the rheological properties so that: 1) the flowability of sludge was improved for transport through the treatment train (via pipes and pumps); 2) the dewaterability of wastewater sludge was enhanced for eventual disposal and; 2) the assimilation of nutrients by microorganisms for further value addition was increased.

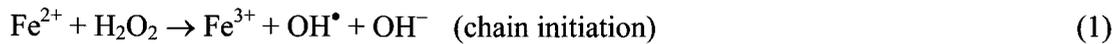
Keywords: Biodegradability, Fenton oxidation, filterability, particle size, rheology, wastewater sludge, ultrasonification.

1. Introduction

The rheology describes the deformation of a flow under the influence of mechanical stress and is a useful tool for the characterization of wastewater sludge (WWS) to control sludge treatment processes, such as dewatering, stabilization and advanced processes, such as value addition [1,2]. In fact, torque rheology was demonstrated to be an appropriate tool to measure sludge flocs' strength in mixing conditions, and to adjust polymer dose and type to control suspension strength for optimizing sludge dewatering [3]. In stabilization (aerobic and anaerobic digestion) and reutilization processes, the rheograms denote principally two correlations: 1) shear stress as a function of shear rate and; 2) viscosity as a function of shear rate and time, describe the properties of sludge flow. These processes are important input design parameters in transportation, storage, operation of bioreactor and pumping [4,5]. Viscosity, the basic rheological parameter has been demonstrated to play an important role in the increase of biodegradability of sludge, strongly influencing mass transfer in aerobic degradation during digestion and fermentation [6].

Pre-treatment processes, namely mechanical disintegration, thermal and thermo-chemical hydrolysis, advanced oxidation processes have been applied in various sludge treatment processes, such as dewatering, digestion, and reutilization to improve treatment efficiency [7,8] . Most of these processes improved sludge dewaterability characteristics by disrupting extracellular polymeric substances (EPS), which is one of the main components of sludge having a strong affinity for water [9, 10]. On the other hand, the pre-treatment processes break up sludge flocs, destroying cell walls and membranes, resulting in release of intracellular organics to the liquid phase and change in sludge composition. This enhances the overall solubilization and biodegradability for stabilization and reutilization processes [11, 12].

Our previous studies have demonstrated the effect of ultrasonification and Fenton oxidation on improvement of the biodegradability of WWS in aerobic digestion and fermentation for value added products [12]. During Fenton oxidation, the ferrous iron (Fe^{2+}) initiates and catalyzes the decomposition of H_2O_2 , resulting in the generation of hydroxyl radicals, a very powerful and non-selective oxidizing agent [13]. The generation of the radicals involves a complex reaction sequence in an aqueous solution.



Further, the hydroxyl radicals can oxidize organics (RH) by abstraction of proton-producing organic radicals (R^\bullet), which are highly reactive and can be oxidized further.



The hydroxyl radicals pass easily through the microbial cell membrane in the sludge, leading to oxidative decomposition of the cell wall. Consequently, organic substances are discharged from the microbial cell into the liquid phase. Moreover, the hydroxyl radicals oxidize the recalcitrant compounds in sludge into biodegradable ones which are further subject to biological treatment [14]. Supposedly, the rheological characteristics of WWS would change during the pretreatment processes. Hence, it will be essential to study the modification of WWS rheology as it will provide a better understanding of the impact of pre-treatment processes on sludge treatment.

The effect of thermal – alkaline pretreatment on rheology of WWS has been investigated [2, 6]. However, none of the studies mentioned the rheology change of WWS during ultrasonification and Fenton oxidation as physical – chemical pre-treatment processes considering the enhancement of value addition. The aim of the present work was to study the influence of pre-treatment processes including ultrasonification and Fenton oxidation on the rheological profile of wastewater sludge. The correlation between improvement of biodegradability and dewaterability, decrease in viscosity, and change in particle size as a function of sludge pre-treatment process was also investigated. The study is based on the hypothesis that pre-treatment of wastewater sludge will modify the rheological properties of wastewater sludge to enhance the dewaterability for eventual disposal as well as assimilation of nutrients by microorganisms during value-addition.

2. Materials and methods

2.1. Sludge

Secondary sludge used in the study was obtained from CUQ (Communauté urbaine de Québec, Canada) aerobic wastewater treatment facility. The sludge total solids (TS) was concentrated from 1.5% (w/v) to higher TS concentrations by gravity settling for 24 hours. The supernatant was discarded; the particulates were diluted with demineralized water to obtain five concentrations (10, 20, 25, 30 and 40 TS g/L) and was homogenized in a Waring™ blender for 30 s. Maximum storage period of sludge was 1 week at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ to minimize microbial degradation. The raw sludge will be henceforth referred to as RS sludge.

2.2. Ultrasonification pre-treatment

The ultrasonification was carried out using ultrasonic homogenizer Autotune 750W (Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, IL, US). The ultrasonification equipment was operated at a frequency of 20 kHz, using a platinum probe with a tip diameter of 25 mm. Four hundred mL of wastewater sludge sample at ambient temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) was placed in a 1 L beaker. The ultrasonic probe was dipped into sludge so that it was immersed at least 2 cm into the sludge. The operation conditions were 0.75 W/cm^2 ultrasonification intensity, 60 min ultrasonification time and 10 – 40 g/L solids concentration range. The ultrasonicated sludge will be henceforth referred to as UIS sludge.

2.3. Fenton oxidation pre-treatment

Three hundred mL of each wastewater sludge sample at different solids concentrations was acidified to pH 3 by using 10 N H_2SO_4 and placed in a 500 mL flask. To initiate Fenton oxidation reaction, H_2O_2 solution and FeSO_4 solution were added to the sludge samples according to the following operating conditions: $0.01 \text{ mL H}_2\text{O}_2/\text{g SS}$; $[\text{H}_2\text{O}_2]_0/[\text{Fe}^{2+}]_0 =$

150. The Fenton oxidation was carried out at ambient temperature for 1 hour using a shaker at 150 rpm. The Fenton oxidized sludge will be henceforth referred to as FS sludge.

2.4. Rheology study

Rheological behaviour of raw and pre-treated sludges was studied by using a rotational viscometer, Brookfield DVII PRO+ (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Stoughton, MA, USA) equipped with Rheocalc32 software. Two different spindles, namely, SC-34 (small sample adaptor), and ultralow centipoise adapter were used with a sample cup volume of 18 mL/50 mL (spindle dependent). The gaps between spindle and respective sample chamber were 1.235 and 4.830 mm, respectively, for ultralow (viscosity range, 1.0–30 mPa s), and small sample (viscosity range, ≥ 30 mPa s) adapter spindle to accommodate sludge flocs. The calibration and viscosity testing procedure for each spindle was carried out as per instrument manual. The viscosity data acquisition and analysis was carried out using Rheocalc V2.6 software, (B.E.A.V.I.S. – Brookfield Engineering Advanced Viscometer Instruction Set). Different rheological models were considering using the viscosity input information as follows:

$$\text{Bingham Plastic } \tau = \tau_0 + \mu_p \gamma \quad (4)$$

$$\text{Casson Law } \sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + \sqrt{\mu_p \gamma} \quad (5)$$

$$\text{NCA/CMA Casson } (1 + a)\sqrt{\tau} = 2\sqrt{\tau_0} + (1 + a)\sqrt{\eta \gamma} \quad (6)$$

$$\text{IPC Paste } \eta = K R^n \quad (7)$$

$$\text{Power Law } \tau = k \gamma^n \quad (8)$$

Time-dependent profile was studied at low shear rate (3.67 s^{-1}) and viscosity of sludge sample at different TS concentrations was measured at 36.69 s^{-1} . The shear rate behaviour was determined from 0.08 to 46.2 s^{-1} . All measurements were done at $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ and viscosity was referred to as “apparent viscosity”.

2.5. Particle size analysis

Particle size analysis was carried out by using Fritsch Laser particle sizer analysette 22, which is based on LASER diffraction principles. During the entire analysis, ultrasonic function was not used in order to retain the native state of sludge flocs. The stirrer and recirculation pump speed were also kept moderate at 250 and 500 rpm, respectively to minimize damage of sludge particles.

For analysis, each sample was diluted approximately 400-fold in tap water and analyzed in triplicate. This method is based on the principles of Fraunhofer diffraction and Mie scattering. The results were then averaged to produce the particle size distribution, and the readings were recorded as particle volume percent in 51 discrete particle ranges between 0.1 to 1000 μm . Floc disruption at D_{50} analogous to the particle size expressed as diameter 50% size distribution cut-off points was chosen as average particle size as it showed the volume median diameter. Standard deviation of particle size measurement was 7%.

2.6. Dewaterability test

Sludge filterability parameter was measured as the capillary suction time (CST) using Triton Electronics CST equipment (model 304M). Sludges were well mixed and poured into 1.8 cm-diameter stainless steel cylindrical reservoir. CST measured in seconds corresponds to the time it takes for the filtrate in a filter paper to travel from an inner circle to an outer circle of perspex plate equipped with electrode block in which electrodes contact the filter paper. All measurements were carried out at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. The CST results were reported as an average of duplicate measurements. Standard deviation of filterability measurement was 6 %.

2.7. Biodegradability test

The biodegradability was determined by inoculating the pre-treated and raw sludges with microbial consortia of 2% (v/v) of fresh activated wastewater sludge (1.5 mL) at solids

concentration of 25 g/L followed by incubation at $25\pm 1^\circ\text{C}$ and 150 rpm on a rotary shaker for 20 days. The biodegradability was assessed by the decrease in TS consumed by the microorganisms after 20 days of incubation (Eq. 9). At the end of incubation, the volume loss due to evaporation was readjusted to 75 mL with Milli-Q water.

$$\text{Biodegradability} = \left(1 - \frac{\text{solids concentration after biodegradation}}{\text{solids concentration before biodegradation}} \right) \times 100\% \quad (9)$$

2.8. General analysis

Total solids (TS), suspended solids (SS) and chemical oxygen demand (COD) were determined per Standard Methods [15]. Chemical oxygen demand was measured in total sludge as total COD (TCOD) and in supernatant as soluble COD (SCOD) by centrifuging at $7650 \times g$ for 15 min at 4°C , followed by filtration of the sludge supernatant. Solubilization was determined by calculating the ratio of SCOD to TCOD.

3. Results and discussion

3.1. Shear-thinning behaviour

Fig. 1 presents the rheograms and apparent viscosity evolution as a function of the shear rate of raw and pre-treated sludges at different solids concentrations (10 to 40 g/L). The relationship between shear stress and shear rate was non-linear, showing non-Newtonian behaviour for all three sludges, except the Fenton oxidized sludges at 10 and 20 g/L in which non-Newtonian behaviour was less pronounced. The shear stress of the pre-treated sludges was lower than the raw sludge at all solids concentration, and UIS and FS at solids concentrations from 25 to 40 g/L followed equivalent decreases in shear stress.

The apparent viscosity of all three sludges decreased with increasing shear rate, showing the shear-thinning behaviour of the sludges, and the decrease was higher for pre-treatment processes. For RS and UIS at solids concentration of 10 g/L, the apparent viscosity decreased rapidly. At 20 to 40 g/L total solids, ultrasonification showed little impact on the diminution of pseudoplastic behaviour when compared to Fenton oxidation. However, the profile of viscosity vs. shear rate curves did not change for either raw or pre-treated sludges.

The pre-treatment processes will typically influence the rheological behaviour by modifying overall sludge properties, including structure, strength and size of sludge flocs and sludge composition. Taking into account the sludge floc, EPS produced during metabolism and autolysis of sludge biomass are mainly responsible for the structural and functional integrity of flocs and thus the physicochemical and biological properties of flocs are determined by means of EPS components [16].

The effect of ultrasonification on rheological behaviour is mainly attributed to hydromechanical shear forces which can disintegrate sludge aggregates and disrupt cells, thus breaking the microbial slurry where the particles constantly interact with each other to

influence a decrease in viscosity [12]. Specifically, the EPS components can glue together to create a three-dimensional matrix due to certain vital forces, such as van der Waals forces, hydrophobic interactions and polymer bridging by various cations due to electrostatic binding with bivalent cations [9]. During ultrasonification process, high energy input (4 000 - 10 000 kJ/kg TS) supplied will cleave the interactions and the binding resulting in floc structure break-up and thus reducing floc strength. Also, the increase in the temperature of bulk liquid (from 22 to 60°C) during ultrasonification can also facilitate the changes in floc stability, as network strength between particles is weakened due to aggressive motion of particles at high temperature [4].

Being a chemical process, Fenton oxidation effects on the decrease in viscosity as a function of operating conditions, i.e., acidification (pH 3) and oxidation by free hydroxyl radicals, will lead to changes in inter-particle interactions between sludge flocs and their components. It can be assumed that the decrease in pH will result in a decrease in electrostatic repulsions between flocs. Consequently, the exposed cross-sectional area of solids was lower; therefore the resistance to flow was reduced leading to lower viscosity [17]. Also, pH extremes (acidity) will also hydrolyze EPS component resulting in instability of extracellular polymers. Moreover, the Fenton reaction involving oxidative decomposition is an oxidative-reductive depolymerization which causes cleavage of linkages in the polymeric backbone of the extracellular polymers [9]. On the other hand, a variety of organic macromolecules in the EPS matrix can have different potential for binding together the floc matrix and sustain good floc strength. Changes in the composition or a removal of some specific compounds, therefore, may lead to changes in the floc strength. As a result, the degradation of EPS and interaction cleavage due to free hydroxyl radicals and acid hydrolysis during Fenton reaction will induce a decrease in strength of sludge flocs resulting in decrease in apparent viscosity and shear-thinning behaviour.

3.2. Effect of time and TS concentration

Fig. 2 shows the evolution of viscosity as a function of time and solids concentration. At constant shear rate (3.67 s^{-1}) over 102 min, the apparent viscosity decreased from 279.94 to 169.96; 159.9 to 100; and 121.8 to 79.9 mPa s, respectively, for raw, ultrasonicated, and Fenton oxidized sludges. Notably, the apparent viscosity of UIS reaches a constant value (in the first 30 min) faster than the RS (later 50 min). The apparent viscosity of FS did not decrease continuously from beginning to the end of the measurement period. It increased around 120 mPa s at the end of the first hour of measurement. The temporary increase could be due to the fact that the suspension of FS was more flocculated as ferric hydroxide was produced during Fenton reaction [13]. The formation of ferric hydroxide influenced the flow of FS under shearing. On the whole, the raw and pre-treated sludges depicted thixotropic behaviour in nature.

The curves presenting the relation between viscosity and TS concentration of raw and pre-treated sludges fitted well into the exponential equations ($Vis_{RS}=1.136e^{1.2008TS}$; $R^2=0.95$; $Vis_{UIS}=1.1985e^{1.0963TS}$; $R^2=0.93$; $Vis_{FS}=1.0413e^{0.9817TS}$; $R^2=0.94$) as shown in Fig. 3. There was not much change in the apparent viscosity at 10 to 20 g/L of TS, and the critical decline of viscosity was observed from 25 g/L of TS. At high solids content, structural units of the suspension are typically suggested to be larger in size and knitted close to each other. As particle concentration increases, a network of particles is formed with the number of interactions increasing rapidly with the volume concentration of particles and thus leading to increase in resistance to flow of sludge materials [5, 18]. Therefore, as solids content increases, so does the viscosity at constant shear rate. As shown in Fig. 3, the apparent viscosity ranged from 2.89–359.7, 2.51–199.2 and 2.68 – 108.3 mPa s, respectively, for raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges at 10–40 g/L solids

concentration. The effect of pre-treatment processes on the decline of viscosity has been explained earlier.

3.3. Rheological models

Table 1 demonstrates various rheological models with varying degree of confidence of fit for raw and pre-treated sludges at different TS concentrations. In the lower shear rate region ($0.08 - 46 \text{ s}^{-1}$), Bingham, Casson and NCA/CMA Casson (modified Casson) fit very well for RS, UIS and FS at 10– 20 g/L and UIS and FS at 25 g/L of TS as shown by high values of confidence of fit (72.1 to 97.2%). The yield stress for the models increased with increasing TS and decreased during the pre-treatment processes. The plastic viscosity followed the same trend as the yield stress with TS increase and pre-treatment. However, the viscoplastic behaviour of RS at 25 g/L and RS, UIS and FS at 30 – 40 g/L was not pronounced in the low shear rate region (confidence of fits are not over 70%).

Meanwhile, Power and IPC Paste (extension of Power) models can characterize fluidity of all sludges throughout range of TS from 10 to 40 g/L (based on high values of confidence of fits). Power model with the fluid parameters, K (consistency index) and n (flow behaviour index) at all TS concentrations for RS, UIS and FS is shown in Fig. 4. It was observed that at 10 to 20 g/L of solids, the sludge was highly fluid with K values below 100 mPas. The cut-off point for fluidity was at 25 g/L which was consistent with the decrease in viscosity for increase in solids concentration. The trend in high cohesiveness of fluid with high solids concentration was attributed to an increase in the energy of cohesion of the 3D network of the sludge due to increase in solids content and thus leading to high degree of inter particle interaction increase [19]. In addition, due to higher solids content, more EPS at the surface of sludge flocs reinforce floc strength and thus lowered sludge fluidity [20]. Meanwhile, the flow behaviour index, n (lower than 1 indicating deviation from Newtonian behaviour) of the sludges decreased with increasing TS showing

reduction in shear-thinning behaviour. The variations in the two rheological parameters indicate stronger non-Newtonian behaviour with increasing solids concentration. Conversely, pre-treatment affected sludge by decreasing pseudoplasticity. The consistency index, K varied from 42.4 to 1188, 25.6 to 620.4 and 52.5 to 317.9; and the corresponding shear-thinning behaviour index, n changed from 0.5 to 0.35, 0.62 to 0.55 and 0.63 to 0.58, respectively, for RS, UIS and FS at solids concentration 10 – 40 g/L. The disintegration of sludge flocs, degradation of EPS and interaction cleavage due to high energy input in ultrasonification and hydroxyl radicals and acid hydrolysis during Fenton reaction are the main reason for the decrease in cohesiveness of sludge fluid (K values for UIS and FS were lower than ones for RS) and for the increase in flowability (n values for UIS and FS were higher than ones for RS). The power law was obeyed by raw and pre-treated sludges at 10 – 40 g/L TS and the variations in the two model parameters will aid in designing heat and mass transfer factors for next fermentation for value addition.

3.4. Change in particle size distribution

Fig. 5 presents the volume particle size distribution of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges at TS concentration from 10 to 40 g/L. Overall, the volume occupied by small particles decreased with increasing TS concentration, and *vice versa* for volume occupied by large particles. The profile was attributed to increase in solids content caused by changes in particle interactions [21, 22]. In a sludge particle size network, as the number of particles increases, the distance is lower between them, which further increases the attractive interactions between them. For raw sludge, frequency particle size distribution vs. particle size plots showed the same profile at different TS concentrations, and higher particle size concentrations were in the range of 10 – 100 μm . Meanwhile, there were some shifts in the range of higher particle size of ultrasonicated and Fenton oxidized sludges in relation to TS concentrations. At TS concentration of 10 – 20 g/L, the peaks

centred in the range of 1 - 10 μm and 10 - 100 μm for UIS and FS, respectively. At 25 - 40 g/L of TS, the particle size ranges were 10 - 100 μm and 100 - 1000 μm . It was also observed that among RS, UIS and FS, volume percentage of small particle sizes (below 10 μm) was the highest (0.54 - 0.38 %) for UIS at TS concentration 10 - 40 g/L, whereas volume occupied by large particles (above 250 μm) was the most pronounced for FS (0.89 - 5.62 %) at TS concentration 10 - 40 g/L. Briefly, ultrasonification resulted in greater decrease in particle size, while, on the contrary, Fenton oxidation increased the particle size. Table 2 presents cut-off diameter d_{50} of RS, UIS and FS at different solids concentrations obtained from cumulative particle size distribution as shown in Fig. 5. The median particle size decreased strongly for UIS, and the increase was significant for FS as compared to RS. It is to be noted that ultrasonification supplied energy referred to as specific supplied energy (E) was calculated using Equation, $E = Pt/vTS$ where, P = ultrasonic power (W) calculated from ultrasonification intensity, t = ultrasonification time (s), v = sample volume (L) and TS concentration (g/L). In this study, specific energy applied in ultrasonification ranges from 4 000 to 10 000 kJ/kg TS was high enough to break flocs as well as cells of sludge and thus reduce floc size [8, 23]. The significant decrease in particle size for UIS associated with the decline in apparent viscosity showed that ultrasonification broke structure and weakened strength of flocs. Meanwhile, the increase in particle size in the sludge after Fenton oxidation was due to a decrease in pH (pH 3). According to Neyens *et al.* [9], particle size can be modified by the presence of acids, i.e. supracolloidal particles (1 - 100 μm range) decrease with acidic pH. Since repulsive electrostatic interactions created from the surface charge of sludge particles are minimized at pH in the range of 2.6 - 3.6, leading to proximity of small particles. On the other hand, Fenton oxidation is a complex chain of reactions in which the ferrous ions generated react with hydroxide ions to form ferric hydroxide and ferric hydroxo

complexes. These compounds possess high capacity of coagulation and flocculation [13]. Therefore, it is suggested that Fenton oxidation caused sludge small particles to flocculate to form larger particles.

Based on the results of decrease in apparent viscosity (discussed in Section 1) and increase in particle size of sludge after pre-treatment by Fenton oxidation, it is to be noted that although the ability of aggregation of sludge particles was enhanced, the floc strength was weakened. This fact was explained by taking into account the compactness degree of sludge flocs defined by the fractal dimension index D_f . According to Mu and Yu [4], D_f can be estimated from the slope of log10 plot of limiting viscosity (η_∞) versus TS concentration ($\eta_\infty \approx TS^{1/(3-D_f)}$). In this study, estimated D_f of RS, UIS and FS was reported to be 1.6, 1.5 and 1.3, respectively, showing flocs of raw sludge as the most compact, followed by ultrasonicated and Fenton oxidized sludges. Fenton oxidation modified the floc structure resulting in increased volume, but weakened the bonds. Thus, when a shear was applied, flocs can be broken up increasing flowability of the media.

3.5. Effect of pre-treatment on dewaterability

The CST measurement was carried out to assess sludge filterability, one of the main factors to evaluate sludge dewaterability. Fig. 6 presents CST values of RS, UIS, and FS at TS concentration 10 – 40 g/L. Ultrasonification, in actuality, has no effect on improvement of filterability, i.e. CST values of both RS and UIS are the same, and in fact CST of UIS was higher than RS at TS 40 g/L. Meanwhile, Fenton oxidation enhanced dewaterability. Notably, at all TS concentrations, Fenton sludges required approximately less than half the time to pass through the filter paper compared to raw and ultrasonicated sludge. When compared with the particle size previously mentioned, ultrasonicated sludge particle size decreased and was in the range of 1 – 100 μm termed as supracolloidal particles. The presence of these particles will deteriorate sludge filterability as it can cause

clogging of the filter [7, 24]. In addition, small particles increase the surface area of flocs leading to increase in frictional resistance to withdrawal of bound water [8, 25]. Moreover, Feng *et al.* [26] demonstrated that ultrasonification with high supplied energy ($> 5\ 000$ kJ/kg TS) also damaged the sludge settleability, a principal factor controlling dewaterability. Therefore, it was planned to apply ultrasound with low specific energy (< 1000 kJ/kg TS) as a pre-treatment for improvement of sludge dewaterability [26, 27]. However, for Fenton oxidized sludges, particle size increased due to certain reasons, i.e., acidic pH and generation of ferric hydroxide and ferric hydroxo complexes (discussed earlier), and thus Fenton oxidation facilitated sludge filterability. Considering the reduction in percentage of CST values of Fenton oxidized sludges (calculated by Eq 1 – CST of FS/CST of RS) at TS concentration of 10 – 40%, dewaterability was shown to decrease with increase in solids concentration (62 - 38% for TS 10 – 40 g/L). More importantly, all sludges at TS 10 – 40 g/L were subjected to Fenton oxidation at the same operating conditions, i.e., same concentrations of H_2O_2 and Fe^{2+} and the aggregation of sludge particles was due to the adjusting Fe^{2+} ions. Thus, higher solids content meant more particles which might result in decrease in the values of dewaterability. Hence, particle size played an important role in controlling sludge dewaterability when using pre-treatment processes.

3.6. Effect of pre-treatment on solubilization and biodegradability

Solubilization (determined as ratio of SCOD to TCOD) decreased with increase in solids content, and was increased for pre-treatment processes as shown in Fig 7. Obviously, organic matter contained in EPS, a matrix embedding cell sludge, and cells was solubilized under powerful hydro-mechanical shear forces generated during ultrasonification. On the other hand, solubilization was increased during Fenton oxidation due to components of EPS and cells which were acid hydrolyzed as well as partially oxidized by hydroxyl

radicals. The pre-treatment also affected the biodegradability (determined as solids reduction after 20 d aerobic degradation), and the effect by ultrasonification was observed to be more pronounced compared to Fenton oxidation. Interestingly, highest percent TS reduction of raw and pre-treated sludges obtained at TS concentration of 25 g/L were 64, 77 and 73% for RS, UIS and FS, respectively. Therefore, 25 g/L was supposed to be the optimal solids concentration for aerobic degradation test using 2% w/v inoculum of the microbial consortia (described in the Materials and Methods section). Augmentation of nutrient availability (increase in solubilization) and amelioration of mass and oxygen transfer (decrease in viscosity as well as decrease in particle size) after the pre-treatment processes are the main reasons for the enhancement of biodegradability. In fact, production of different value added products, such as *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma viride* based biopesticides, *Rhizobium* based biofertilizers and enzymes using WWS as raw material have demonstrated 25 g/L as the optimal solids concentration in our laboratory [2,6].

4. Conclusions

The study on the modification of rheology of wastewater sludge during pre-treatment processes led to following conclusions:

1. Fenton oxidation and ultrasonification caused a decrease in apparent viscosity and shear-thinning behaviour of the sludge.
2. Raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges depicted thixotropic behaviour and exponential correlation with solids concentration.
3. The Power law described flow characteristics of raw and pre-treated sludge in the whole range of solids concentration 10 – 40 g/L. The variation of power model constants, i.e., decrease in consistency index, K and increase in corresponding shear-thinning behaviour index, n signified the effect of pre-treatment processes on reduction in pseudoplasticity of sludge.
4. Particle size decreased for ultrasonicated sludge due to hydromechanical shear forces, and increased for Fenton oxidized sludge caused by reaggregation of sludge particles.
5. Fenton oxidation enhanced dewaterability due to increase in aggregation of sludge floc as large particle size increased after the oxidation.
6. Both Fenton oxidation and ultrasonification improved biodegradability of sludge as the pre-treatment processes caused decline in viscosity and increase in solubilization, thus leading to enhanced mass and oxygen transfer during biodegradation.

Acknowledgments

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grants A4984 and 355254, STP235071, Canada Research Chair), and INRS-ETE for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors and should not be construed as opinions of the U.S. Environmental Protection Agency.

Appendix

Scientific Notations

τ	shear stress (mPa)
τ_0	yield stress (shear stress at 0 rpm of spindle, mPa)
γ	shear rate (s^{-1})
K	consistency index ($mPa \cdot s^n$)
N	flow behaviour index (dimensionless)
μ_p	plastic viscosity ($mPa \cdot s$)
R	rotational speed (rpm)

Abbreviations

CST	capillary suction time (s)
ECP	extracellular polymers
FS	fenton oxidized sludge
RS	raw sludge
SCOD	soluble chemical oxygen demand (mg/l)
TCOD	total chemical oxygen demand (mg/l)
UIS	ultrasonicated sludge
WWS	wastewater sludge

References

1. C. Giordano, A. Pollice, G. Laera, D. Saturno and G. Mininni, Influence of solid retention time on the rheology of MBR sludge, *Water Sci. Technol.* 56 (8) (2007) 151–159.
2. S. K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, J.R. Valéro, R.Y. Surampalli, *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge – Rheology and formulation studies, *Chemosphere* 67 (2007) 674–683.
3. M. M. Abu-Orf and B. Örmeci, Measuring sludge network strength using rheology and relation to dewaterability, filtration, and thickening— Laboratory and full-scale experiments, *Journal of Environmental Engineering* 131 (8) (2005) 1139-1146.
4. Y. Mu, H.-Q. Yu, Rheological and fractal characteristics of granular sludge in an upflow anaerobic reactor, *Water Res.* 40 (2006) 3596 – 3602.
5. I. Seyssiecq, B. Marrot, D. Djerroud, N. Roche, In situ triphasic rheological characterisation of activated sludge, in an aerated bioreactor, *Chem. Engng. J.* 142 (2008) 40-47.
6. M. Verma, S.K. Brar, A.R. Riopel, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, Pre-treatment of wastewater sludge biodegradability and rheology study, *Environ. Technol.* 28 (2007) 273–284.
7. R. Dewil, J. Baeyens, R. Goutvrind, Ultrasonic Treatment of Waste Activated Sludge, *Environmental Progress* 25 (2) (2006) 121-128.
8. C. Bougrier, C. Albasi, J.P. Delgenès, H. Carrère, Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability, *Chemical Engineering and Processing* 45 (2006) 711–718.

9. Elisabeth Neyens, J. Baeyens, R. Dewil, B. De Heyder, Advanced sludge treatment affects extracellular polymeric substances to improve activated sludge dewatering, *J. Hazard. Mater.* 106B (2004) 83–92.
10. F. Wang, S. Lu, M. Ji, Components of released liquid from ultrasonic waste activated sludge disintegration, *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006) 334–338.
11. M. Tokumura, M. Sekine, M. Yoshinari, H. T. Znad, Y. Kawase, Photo-Fenton process for excess sludge disintegration, *Process Biochemistry* 42 (2007) 627–633.
12. T.T.H. Pham, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, Ultrasonification of wastewater sludge-Consequences on biodegradability and flowability, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 891-898.
13. E. Neyens, J. Baeyens, A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique, *J. Hazard. Mater.* B98 (2003) 33–50.
14. J. L. de Morais, P. P. Zamora, Use of advanced oxidation processes to improve the biodegradability of mature landfill leachates, *J. Hazard. Mater.* B123 (2005) 181–186.
15. APHA, AWWA and WEF, Standard methods for the examination of water and Wastewater, 21st Edition (2005)
16. H.-C. Flemming, J. Wingender, Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects, *Water Sci. Technol.* 43 (6) (2001) 1–8.
17. N. Tixier, G. Guibaud, M. Baudu, Effect of pH and ionic environment changes on interparticle interactions affecting activated sludge flocs: A rheological approach, *Environ. Technol.* 24 (2003) pp 971-978.

18. L. H. Mikkelsen, K. Keiding, The shear sensitivity of activated sludge: an evaluation of the possibility for a standardised floc strength test, *Water Res.* 36 (2002) 2931–2940.
19. M. Mori, I. Seyssiecq, N. Roche, Rheological measurements of sewage sludge for various solids concentrations and geometry, *Process Biochemistry* 41 (2006) 1656–1662.
20. M. Mori, J. Isaac, I. Seyssiecq, N. Roche, Effect of measuring geometries and of exocellular polymeric substances on the rheological behaviour of sewage sludge, *Chemical Engineering Research and Design* 86 (2008) 554–559.
21. W. A. McMinn, J. Keown, S. J. Allen, M. G. Burnett, Effect of floc concentration on the rheology of a ferric floc, *J Chem Technol Biotechnol* 79 (2004) 126–131.
22. S.K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, J.R. Valéro, Particle size variations during production of wastewater sludge-based *Bacillus thuringiensis* biopesticides, *Pract. Period. Hazard. Toxic Radioactive Waste Manage.* 12 (1) (2008) 30–39.
23. E. Gonze, S. Pillot, E. Valette, Y. Gonthier, A. Bernis, Ultrasonic treatment of an aerobic activated sludge in a batch reactor, *Chemical Engineering and Processing* 42 (2003) 965-975.
24. X. Yin, P. Han, X. Lu, Y. Wang, A review on the dewaterability of bio-sludge and ultrasound pretreatment, *Ultrason. Sonochem.* 11 (2004) 337–348.
25. J. I. Houghton, J. E. Burgess, T. Stephenson, Off-line particle size analysis of digested sludge, *Water Res.* 36 (2002) 4643–4647.
26. X. Feng, H. Lei, J. Dengb, Q. Yua, H. Li, Physical and chemical characteristics of waste activated sludge treated ultrasonically, *Chemical Engineering and Processing* 48 (2009) 187–194.

27. S. Na a, Y. Kim, J. Khim, Physiochemical properties of digested sewage sludge with ultrasonic treatment, *Ultrason. Sonochem.*14 (2007) 281–285.

Table 1 Rheological models of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges

Solids concentration, g/L		10			20			25			30			40		
		RS	UIS	FS	RS	UIS	FS	RS	UIS	FS	RS	UIS	FS	RS	UIS	FS
Bingham Law	Plastic viscosity ($\eta, 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	3.05	2.26	2.03	12.8	5.63	7.51	34.7	7.25	10.2	34.9	37.4	24.2	68.9	68.9	36.5
	Yield stress ($\tau_0, 10^{-1} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$)	0.96	0.29	0.31	1.74	1.16	2.51	7.96	5.45	4.46	7.57	7.96	4.46	17.0	17.0	9.72
	Confidence of fit (%)	89.0	92.1	91.9	91.9	82.6	72.1	2.7	95.5	96.4	38.7	2.7	5.4	18.7	18.7	9.9
Casson Law	Plastic viscosity ($\eta, 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	1.96	1.57	1.26	5.89	3.63	4.14	27.1	2.01	3.87	26.4	27.1	17.3	44.4	44.4	21.2
	Yield stress ($\tau_0, 10^{-1} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$)	0.41	0.13	0.18	1.08	0.48	1.22	2.61	3.99	2.81	2.85	2.61	1.5	6.88	6.68	4.4
	Confidence of fit (%)	97.2	92.1	87.9	94.7	94.4	79.7	56.8	96.2	97.2	68.8	56.8	56.5	57.7	57.7	51.7
NCA/CM A Casson	Plastic viscosity ($\eta, 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	1.96	1.57	1.26	5.89	3.63	4.14	27.1	2.01	3.87	26.4	27.1	17.3	44.4	44.4	21.2
	Yield stress ($\tau_0, 10^{-1} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-2}$)	0.37	0.12	0.17	0.99	0.44	0.69	1.47	2.25	1.59	2.85	1.47	0.85	3.88	3.88	4.4
	Confidence of fit (%)	97.2	92.1	87.9	94.7	94.4	79.7	56.8	96.2	97.2	68.8	56.8	56.5	57.7	57.7	51.7
IPC Paste	Shear sensitivity factor (n_s)	13.0	7.02	7.66	31.7	18.0	56.8	173.3	148.1	115.1	212.2	173.3	110.5	399.7	399.7	206.9
	10 rpm viscosity (η_{10})	0.54	0.47	0.57	0.67	0.54	0.5	0.38	0.74	0.64	0.46	0.38	0.39	0.44	0.44	0.42
	Confidence of fit (%)	87.6	84.1	76.4	86.3	92.4	85.7	85.6	96.9	98.1	87.0	85.6	83.6	83.9	83.9	82.6

Shaded regions indicate lower confidence of fits where the rheological models were not obeyed.

Table 2 Cut-off diameter d_{50} of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges at TS concentration 10 – 40 g/L

TS, g/L	Cut-off diameter, d_{50} (μm)		
	Raw sludge	Ultrasonicated sludge	Fenton oxidized sludge
10	31.3 (± 2.2)	12.9 (± 0.9)	50.3 (± 3.5)
20	33.3 (± 2.3)	13.6 (± 0.95)	52.3 (± 3.7)
25	43.0 (± 3.0)	12.6 (± 0.88)	53.9 (± 3.8)
30	39.8 (± 2.8)	12.3 (± 0.86)	52.3 (± 3.7)
40	41.2 (± 2.9)	14.0 (± 0.98)	55.6 (± 3.9)

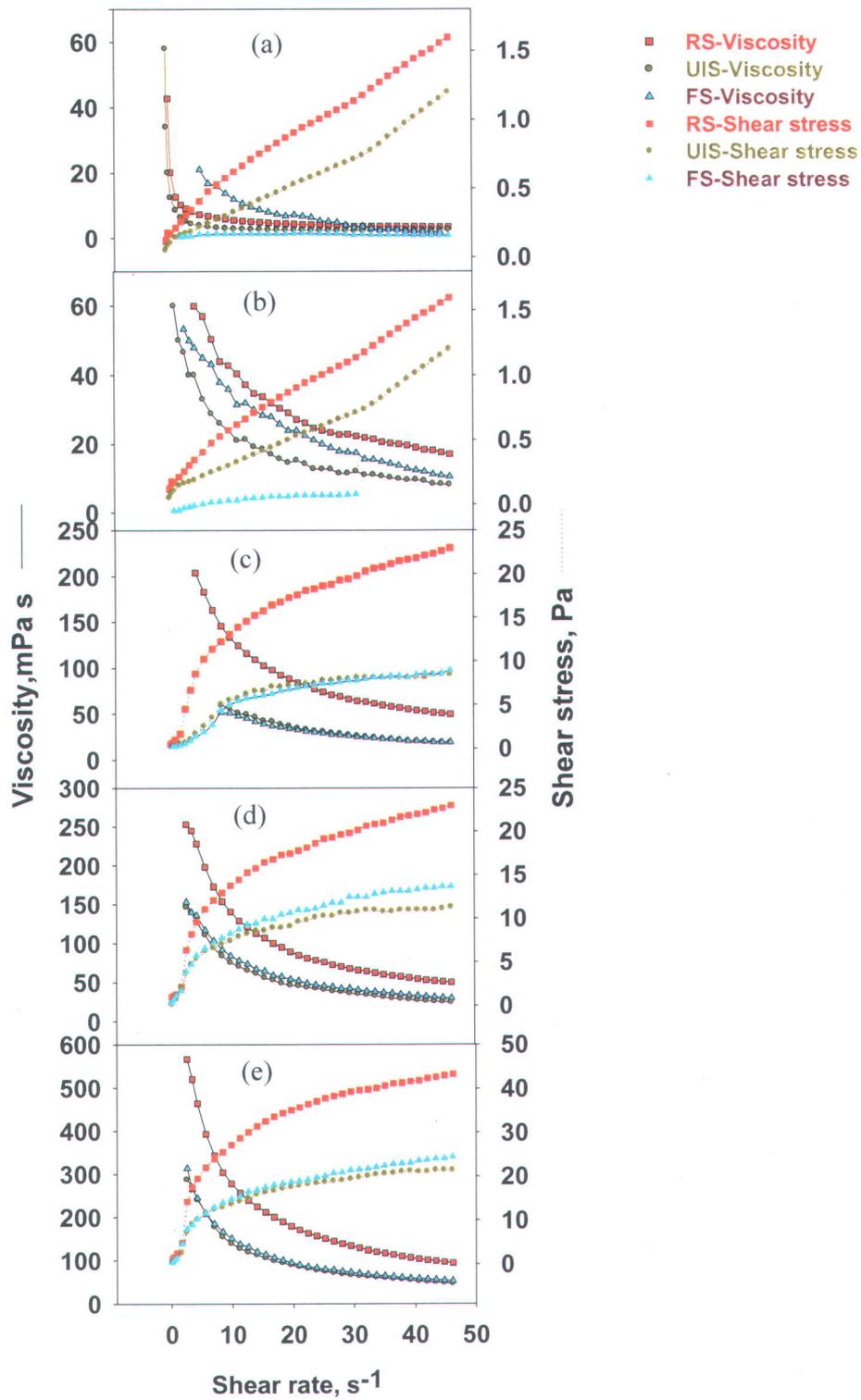


Figure 1 Viscosity and shear stress vs shear rate profiles of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges at TS concentrations of a) 10 g/L; b) 20 g/L; c) 25g/L; d) 30 g/L; and e) 40 g/L

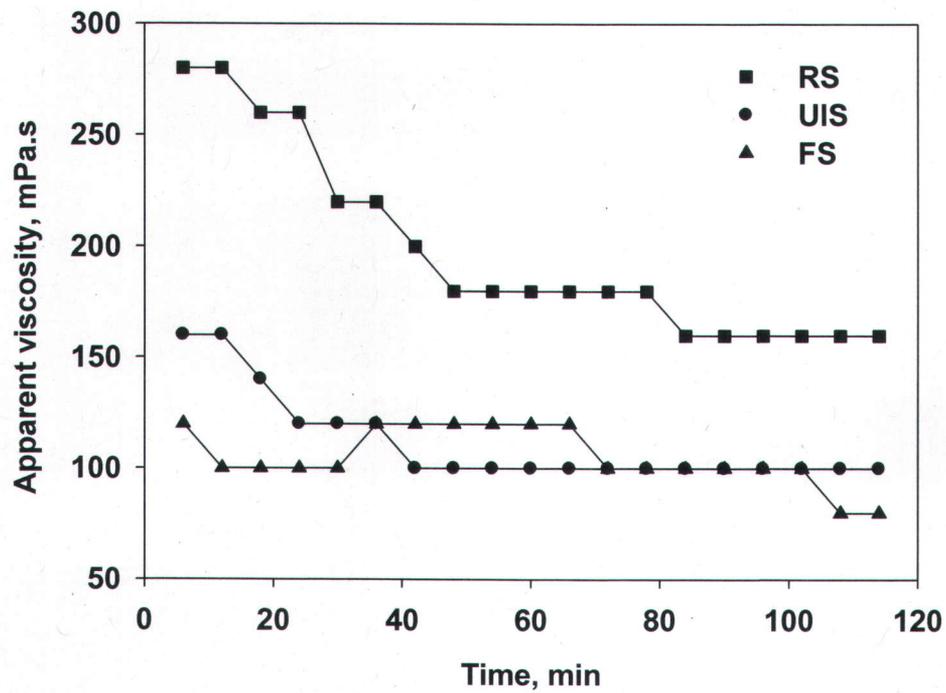


Figure 2 Thixotropic behaviour of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges (TS = 25 g/L)

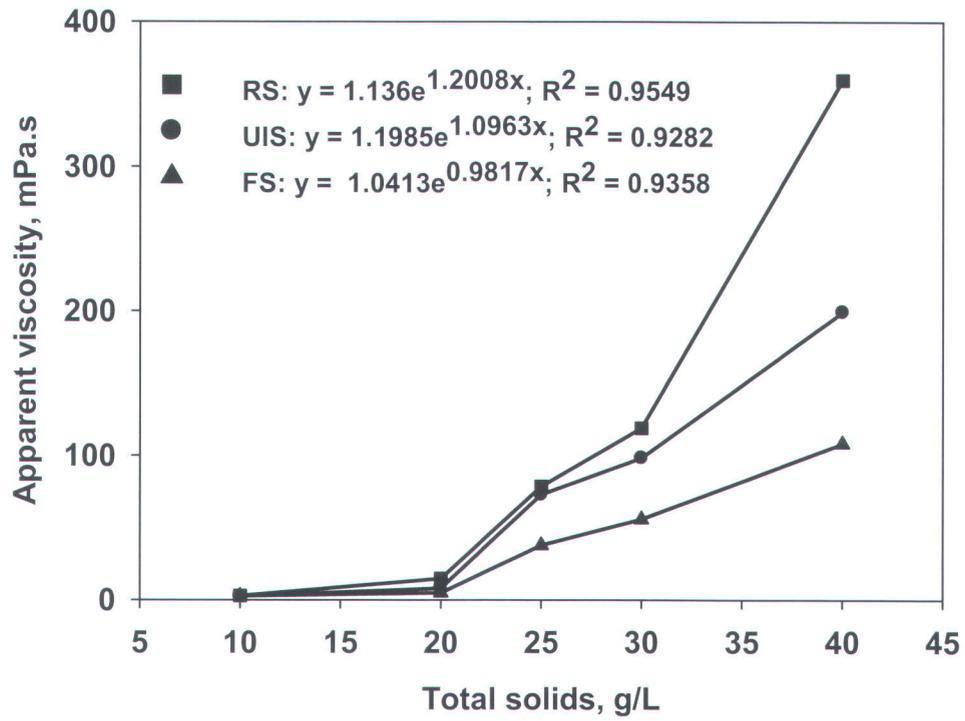


Figure 3 Evolution of viscosity as function of solids concentration and pre-treatment processes

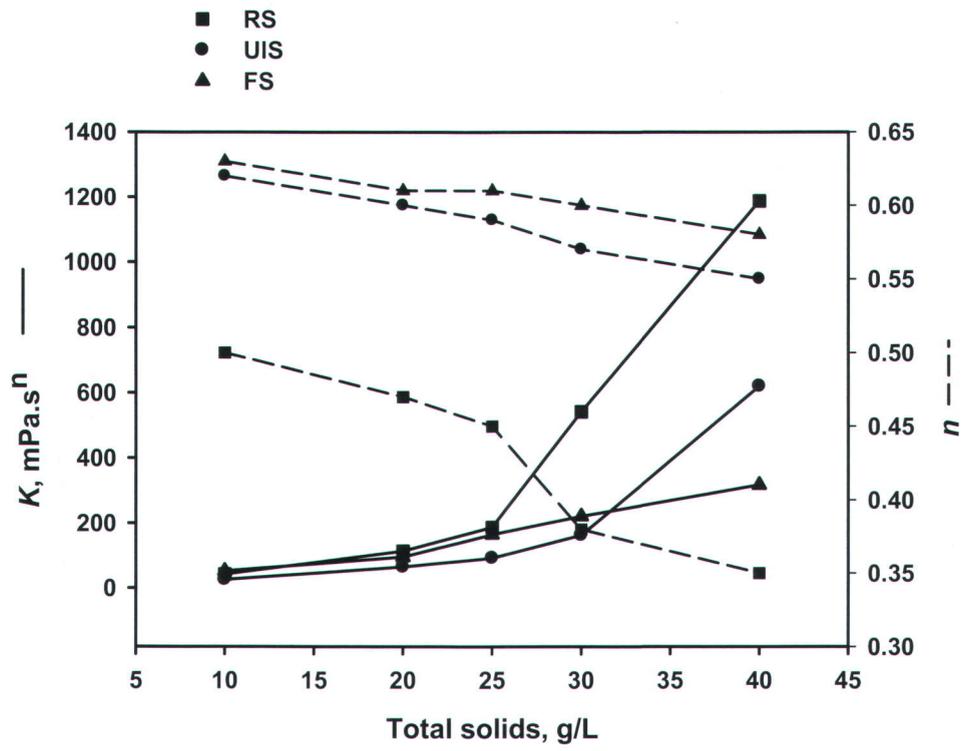


Figure 4 Evolution of Power model parameters as function of solids concentration and pre-treatment processes

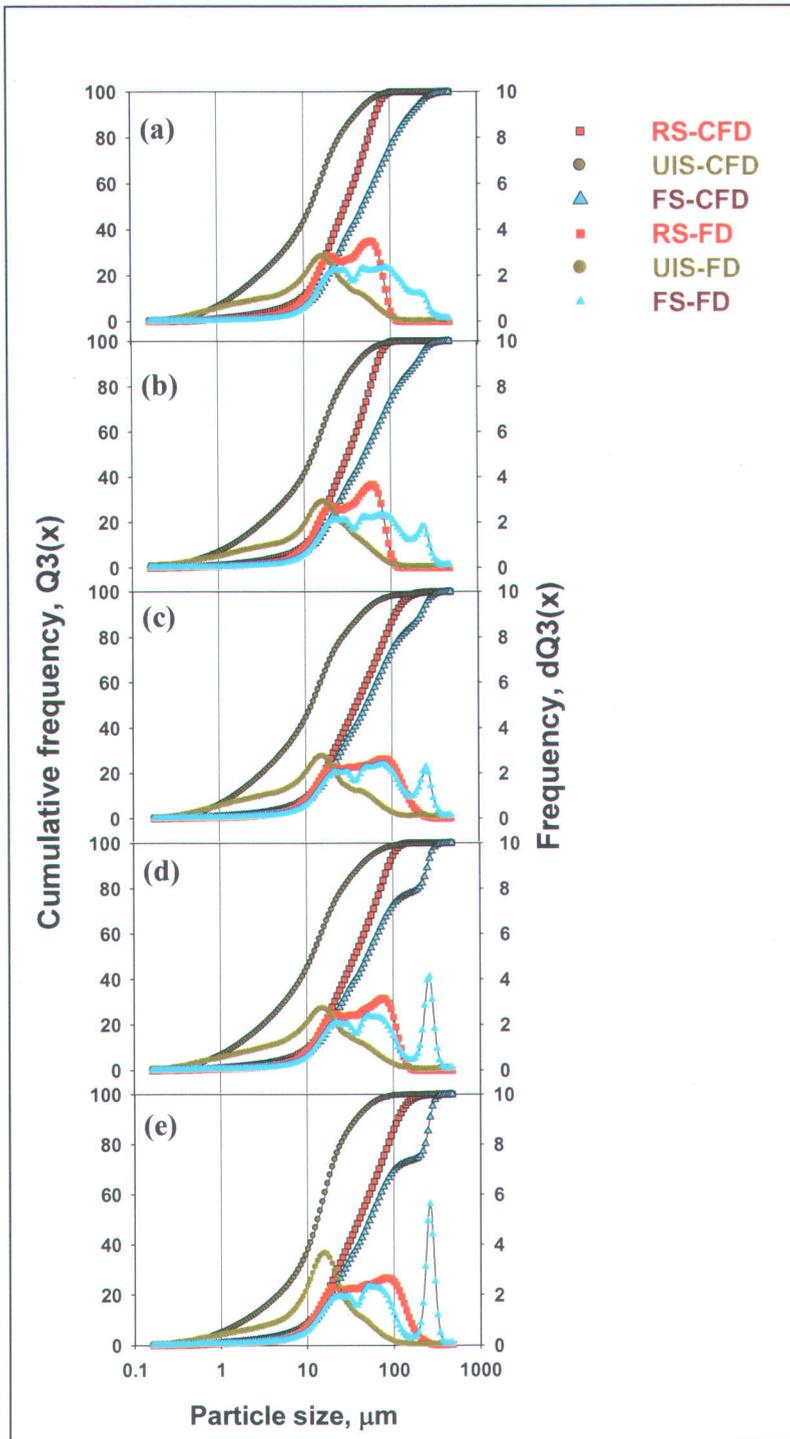


Figure 5 Volume particle size distribution of raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges at TS concentrations of a) 10 g/L; b) 20 g/L; c) 25 g/L; d) 30 g/L; e) 40 g/L. Exponential curves in the figure represent cumulative frequency distribution, and waveform curves represent frequency distribution for raw and pre-treated sludges.

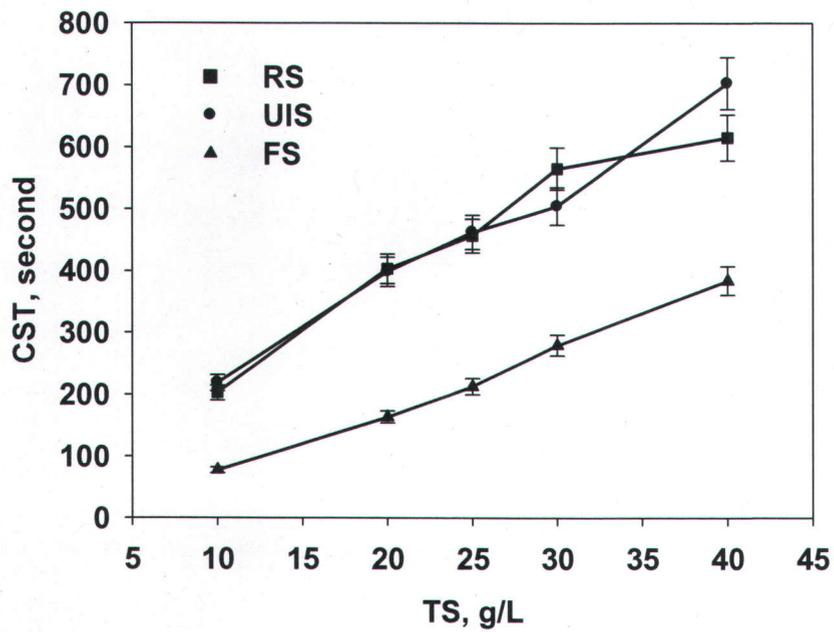


Figure 6 CST measurement of raw, ultrasonicated and Fenton sludges at TS 10 – 40 g/L

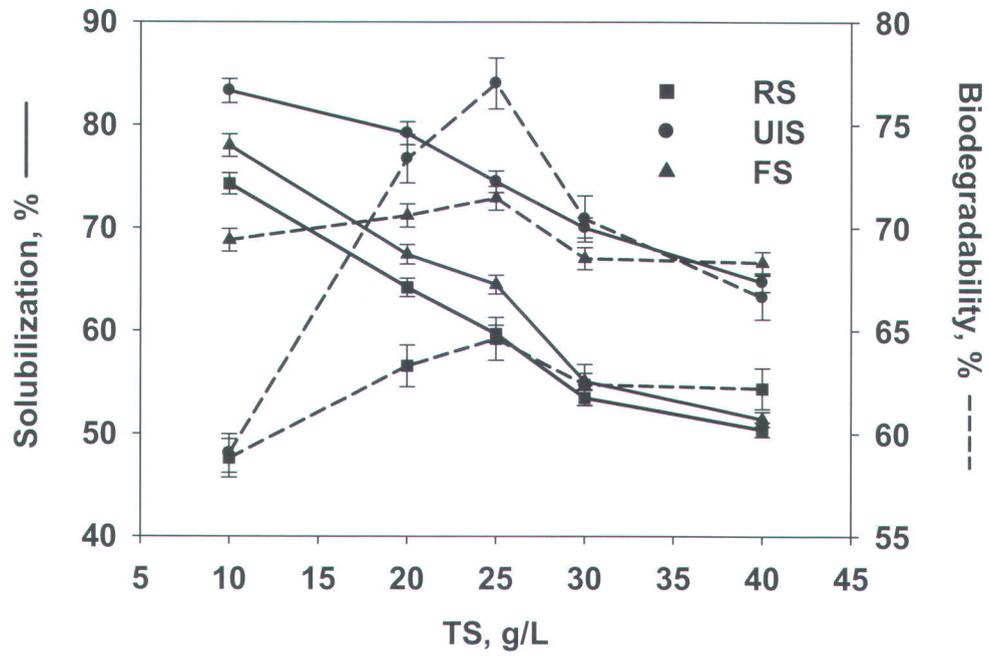


Figure 7 Effect of pre-treatment on solubilization and biodegradability of sludge

**CHAPITRE 4 EFFET DE PRÉTRAITEMENT SUR LA BIODÉGRADATION DU
PHTALATE DE DI-(ÉTHYLHEXYLE)**

(Résultats de l'objectif 5)

**4.1. Effect of ultrasonification and Fenton oxidation on biodegradation of
bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in wastewater sludge**

T. T. H. Pham^a, S. K. Brar^a, R. D. Tyagi^{a*} and R.Y. Surampalli^b

^aINRS-ETE, Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec (QC) G1K 9A9, Canada

^bUS Environmental Protection Agency, P.O. Box 17-2141, Kansas City, KS 66117, USA

Chemosphere (In press)

Résumé

L'étude systématique (avant et après le prétraitement, la dégradation aérobie et la fermentation de *Bacillus thuringiensis*-Bt) de la présence du phtalate de di-(2-éthylhexyle) (DEHP) et de ses métabolites, à savoir les 2-éthylhexanol, 2-éthylhexanal, et acide 2-éthylhexanoïque, dans les boues d'épuration a été effectuée. Le DEHP et l'acide 2-éthylhexanoïque ont été observés à des concentrations importantes. Quant à eux, les 2-éthylhexanol et 2-éthylhexanal ont été observés à de faibles concentrations dans des boues non traitées et traitées par l'ultrasonification et l'oxydation Fenton. Pour la dégradation aérobie, les microorganismes indigènes présents dans les boues ont été responsables de la biodégradation du DEHP, résultant en des enlèvements en masse du DEHP de 72%, 89% et 85%, et de l'acide 2-éthylhexanoïque de 71%, 84%, 79%, respectivement pour RS, UIS et FS. Bt a été jugée capable de dégrader le DEHP, résultant en la réduction de la concentration du DEHP de 18%, 38% et 25% pour RS, UIS et FS dans la fermentation. Le prétraitement de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton ont amélioré la biodégradabilité des boues d'épuration et la biodisponibilité des composés organiques cibles pour la digestion et la fermentation. Ainsi, la production des biopesticides à base de Bt à partir des boues d'épuration peut être appliquée en toute sécurité lors de la prise en considération des contaminants du phtalate.

Mots clés: *Bacillus thuringiensis*, digestion aérobie, fermentation, oxydation Fenton, phtalate de di(2-éthylhexyle), ultrasonification.

Abstract

The presence of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and its metabolites, i.e. 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanal, and 2-ethylhexanoic acid in wastewater sludge (WWS) were investigated during aerobic digestion and *Bacillus thuringiensis* (Bt)-based fermentation of WWS. Ultrasonification and Fenton oxidation pretreatment was applied to improve biodegradability of WWS and bioavailability of the target compounds for digestion and fermentation. DEHP and 2-ethylhexanoic acid were observed at higher concentration, meanwhile 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal were observed at lower concentration in WWS. After 20-days aerobic digestion, DEHP removals were 72, 89, and 85%, and 2-ethylhexanoic acid removals were 71, 84, 79%, respectively for raw, ultrasonicated, and Fenton oxidized sludges. Bt was found to degrade DEHP, leading to DEHP removal of 21, 40, and 30%, respectively for raw, ultrasonicated, and Fenton oxidized sludges in the fermentation. The results suggested that aerobic stabilization and Bt-based fermentation can remove the phthalates, and pre-treatment of WWS was also effective in improvement of DEHP biodegradation. Hence, Bt-based biopesticide production from WWS can be applied safely when taking into consideration the phthalate contaminants.

Key words: aerobic digestion, bis(2-ethylhexyl) phthalate, *Bacillus thuringiensis*, Fenton oxidation, fermentation, ultrasonification.

1. Introduction

Wastewater sludge (WWS) contains contaminants, such as heavy metals, pathogens and toxic organic compounds which impede its disposal or its use as a raw material for the production of value added products (VAPs). During the production of VAPs, the pathogens are removed during sterilization (a necessary step in a bioconversion process) and toxic metals can be removed by various processes developed for sludge decontamination (Barnabé *et al.*, 2007). There are however, concerns about the presence of trace organic compounds, which pose potential risks to environment and human health. Thus, the toxic organic compounds are considered as priority pollutants in WWS and must be monitored more closely.

Phthalates classified as endocrine disrupting compounds (EDCs) are anthropogenic chemicals of concern due to their wide range utilization in the manufacture of polyvinyl chloride (PVC) and other resins, plasticizers, and insect repellents. Phthalates can enter the environment through losses during manufacture and by leaching from final product, as they are not chemically bonded to the polymeric matrix. WWS is found to be the point sources of these compounds in wastewater treatment plants. Due to their low water solubility and high hydrophobicity, they have a tendency to sorb to sediments and suspended solids (Scrimshaw and Lester, 2003; Abad *et al.*, 2005; Barnabé *et al.*, 2009).

Among the phthalates, bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) come to the fore due to certain reasons: DEHP is one of the most significant of the phthalates since it is used as a plasticizer in large quantities (Gómez-Henz and Aguilar-Caballos, 2003); its recalcitrance with the length of alkyl side chain influencing amenability to degradation (Amir *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007); biodegradation of the compound produces breakdown products, 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanal and 2-ethylhexanoic acid that are found to be more toxic than the original

compound (Horn *et al.*, 2004; Nalli *et al.*, 2006). This particular di-ester plasticizer is amongst the most abundant organic contaminants in urban wastewater and sewage sludge and has been classified as a priority organic pollutant (CEC, 2000; Scrimshaw and Lester, 2003).

Pre-treatment processes have been applied prior to bioconversion of WWS in order to improve biodegradability of the sludge and thus performance of aerobic or anaerobic digestion as well as increase the yield of value added products during bioconversion (Bougrier *et al.*, 2006; Pham *et al.*, 2009). Similarly, several pre-treatment processes, such as ultrasonication, thermal treatment and enzymatic pretreatment were found to be effective in the removal and detoxification of DEHP in sludge (Gavala *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007; Barnabé *et al.*, 2009). In fact, pre-treatment has been found to improve the bioavailability of the phthalate in sludge, and thus make the compound more susceptible for the further biodegradation (Barnabé *et al.*, 2009).

Moreover, the conventional sludge treatment processes, such as composting and stabilization (aerobic and anaerobic digestion) of sludge were demonstrated to be able to remove phthalates due to the role of indigenous microorganisms in sludge (Alatrisme-Mondragon *et al.*, 2003; Gavala *et al.*, 2004; Marttinen *et al.*, 2004; El-Hadj *et al.*, 2006; Pakou *et al.*, 2009). Additionally, pure microbial strains isolated from sludge have been shown to be capable of utilizing DEHP as a sole carbon and energy source (Chang *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2005; Roslev *et al.*, 2007).

B. thuringiensis (Bt) based insecticidal toxins production using WWS as raw material has been studied with success in our lab (Vidyarthi *et al.*, 2002; Yezza *et al.*, 2005). Furthermore, the pre-treatment processes, i.e., ultrasonication and Fenton oxidation were found to be effective in the improvement of Bt based biopesticide production using WWS (Pham *et al.*, 2010).

However, the concern is the fate of DEHP, one of the toxic compounds formed during pretreatment and WWS based production of the value-added product.

Hence, the objective of the present work is to investigate the presence of DEHP and its metabolites, i.e. 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanal, and 2-ethylhexanoic acid during the pretreatment processes (ultrasonication and Fenton oxidation) and subsequent Bt fermentation of WWS. The main goal of the study is the enhancement of DEHP removal during WWS bioconversion preceded by pretreatment processes. Moreover, the quantification of the toxic compounds is essential to ensure environmentally safe application of value-added products derived from WWS.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and glassware

DEHP (98%) was purchased from Fluka/Sigma-Aldrich Co. (Oakville, Ontario). 2-ethylhexanol (99.6%), 2-ethylhexanal (96%) and 2-ethylhexanoic acid (99%) were obtained from Sigma-Aldrich Co. (Oakville, Ontario). HPLC-grade acetone and HPLC-grade dichloromethane were purchased from Fisher Scientific (Montreal, Quebec) and used for cleaning, extraction and dilution purposes. All solvents were tested for potential contamination with DEHP and related breakdown products during each gas chromatograph (GC) analysis (blank sample).

All glassware was submerged in 0.2 g/L-NaOH solution for 24 h, rinsed by Milli-Q water in a ultrasound bath for 30 min, and then rinsed with acetone and lastly with dichloromethane two times.

2.2. Sampling

Secondary sludge sample was collected from biofiltration treatment system of CUQ (Communauté urbaine de Québec, Canada). Samples were collected in 2.5 L - amber colored bottles which were pre-rinsed with Milli-Q water, acetone and dichloromethane to avoid potential contamination of samples with phthalate. After collection, samples were stored in cold room at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ for a maximum of one week for further experiments.

2.3. Experimental procedure

2.3.1. Fenton oxidation pre-treatment

Three hundred milliliters of wastewater sludge sample were acidified to pH 3 with 10 N H_2SO_4 and placed in a 500 mL flask. H_2O_2 stock solution (30 % v/v) and FeSO_4 stock

solution (0.01 g/L) were added to the sludge samples to initiate Fenton oxidation reaction. The volumes of stock solutions of the reagents added to the samples were calculated according to reagent concentrations required for experiments. Fenton oxidation was carried out in the flasks placed in a shaker at 150 rpm under following conditions: 0.01 mL H₂O₂/g suspended solids (SS), 150 [H₂O₂]₀/[Fe²⁺]₀, 25 g/L total solids (TS), at 25 °C and 60 min duration.

2.3.2. Ultrasonification pre-treatment

Ultrasonification was carried out using ultrasonic homogenizer Autotune 750W (Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, Illinois, US). The ultrasonification equipment was operated at a frequency of 20 kHz, using a platinum probe with tip diameter of 25 mm. Four hundred milliliters of wastewater sludge sample at ambient temperature was placed in a 1 L beaker. The ultrasonic probe was dipped in such a way that it was immersed 2 cm into the sludge. The conditions of the ultrasonification were 0.75 W/cm² ultrasonification intensity, 60 min ultrasonification time, and 25 g/L TS. The raw, ultrasonicated and Fenton sludges were abbreviated as RS, UIS and FS, respectively.

2.3.3. Aerobic degradation

Examination of biodegradability was carried out by inoculating RS, UIS and FS with microbial consortia of 2 % (v/v) of fresh activated wastewater sludge followed by incubation of inoculated pre-treated sludge at 25 ± 1 °C at 150 rpm on a rotary shaker for 20 days. The biodegradability was assessed by the decrease in total solids (TS) caused by consumption of microorganisms after incubation (20 days) (Eq 1). At the end of incubation, the volume loss due to evaporation was readjusted to 75 mL with Milli-Q water.

$$\text{Biodegradability} = \left(1 - \frac{\text{TS concentration after biodegradation}}{\text{TS concentration before biodegradation}} \right) \times 100\% \quad (\text{Eq 1})$$

2.3.4. Bt shake-flask fermentation

A loopful of Btk from TSA plates was used to inoculate a 500-mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of sterilised TSY medium. The flask was incubated on a rotary shaker at 300 rpm at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 12 h. A 2% (v/v) inoculum from this flask was then used to inoculate 500-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of sterilized sludge media. These flasks were incubated for 12 h and used as a second inoculum. The Erlenmeyer flasks (500-mL) containing 100 mL RS, UIS and FS were inoculated with a 2.0% (v/v) second inoculum. The flasks were incubated at 300 rpm and $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h. Culture samples were withdrawn from the flasks at 48 h of the inoculation to evaluate Bt growth (total cells) and to analyze the concentration of DEHP and its metabolites.

2.4. Analytical method

2.4.1. Extraction

The sludges were kept at -20°C for 24 h to be frozen before lyophilization in a freeze-dryer. The freeze dried sludges were homogenized in a blender with glass container, and then kept in a desiccator for further extraction and analysis.

The target compounds were extracted from sludge matrices with dichloromethane in an ultrasonic water bath. The extraction was carried out in 15 mL glass centrifuge tubes. An amount of 0.5 g freeze dried sludge was transferred in the tube, and 10 mL of dichloromethane was added. The sludge and solvent in the tubes were vortex mixed for 1 min. The tubes were sonicated in the ultrasonic water bath in 30 min and then centrifuged for 5 min at 150 rpm. The liquid phase was transferred to 15-mL glass tube and the extraction procedure was repeated twice with the residues. All extracts from same sludge matrix were collected and concentrated to 2 mL under N_2 . The extracts were diluted with dichloromethane 20 times in

2-mL vials for GC analysis. n-pentadecane was added into every sample at the end of extraction as an internal standard. The recovery of the extraction procedure was evaluated by spiking sludge samples with known concentrations of the target compounds.

2.4.2. Gas chromatography

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis was carried out on a GC/MS Clarus 500 (Perkin Elmer) and a VF-5ms capillary column (Varian), 30 m, 0.25 mm ID and 0.25 μ m film thickness. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. The injector and transfer line were maintained at 250 ° C and 280 ° C, respectively. All injection volumes were 1 μ L in the splitless mode (40:1). The column temperature was initially held at 60 \pm 1°C for 2 min, ramped to 300°C at a rate of 15°C/min, then temperature was held at 300°C for 10 min. The mass spectrometer was used in electron ionization mode (70 eV). The source temperature was 180°C. Selected ion monitoring (SIM) was used for quantitative analysis; the m/z values of the ions monitored are listed in Table 1.

Calibration curves were constructed by quadratic regression of peak areas of standard solutions against their respective concentrations. A mixture of the target compounds was prepared in dichloromethane as standard solutions at concentrations ranging from 1.2 to 12.1 mg/L for DEHP, from 1.0 to 10.2 mg/L for 2-ethylhexanol, from 1.0 to 10.1 mg/L for 2-ethylhexanal, and from 1.1 to 11.1 mg/L for 2-ethylhexanoic acid.

The phthalates were identified on the basis of their retention times relative to the internal standards. Quantification was based on peak areas in relation to internal standards, and quadratic 5-point calibration curves.

2.4.3. Method validation

Contamination was verified by analyzing blanks for sample preparation (rinsed glassware, solvent, extraction, concentration) and their values were under the detection limits. The lowest concentration calibration standard was analyzed at every 10th injection to ensure acceptable instrument performance.

Estimation, establishment and evaluation of limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were performed according to Quebec governmental procedures for quality control in analytical chemistry (Protocole pour la validation d'une methode d'analyse en chimie, 2009). The estimated LOD was calculated as 3 times the standard deviation of 10 replicates for low level concentration compounds in dichloromethane. LOD and LOQ were calculated as 3 times and 10 times, respectively, for the standard deviation of 10 replicates of a low level sample having concentration of the compounds being 5 to 7 times the estimated LOD. The evaluation of these limits was based on the ratio of conformity which was the ratio of the mean of the replicates to the calculated LOD. The conformity ratio must be in the interval of 4 to 10. To obtain LOD and LOQ in dried matter, the LOD and LOQ values were multiplied by the volume of the solution of sludge matter in dichloromethane and divided by the dry matter weight. The values of LOD and LOQ along with the conformity ratios are presented in Table 2. The percentage recovery was monitored using spiked and non-spiked samples and is presented in Table 2.

Concentrations in sludge contents are expressed as $\mu\text{g}/\text{kg}$ on the basis of dry weight. All samples were analyzed three times and results were given as means \pm standard deviation.

2.5. Characterization of sludges

Total solids and chemical oxygen demand (COD) were determined as per Standard Methods (APHA, AWWA & WPCF, 2005). Chemical oxygen demand was measured in total sludge (TCOD) and in supernatant (SCOD) by centrifuging at 7650 g for 15 min at 4 ° C, followed by filtration of the sludge supernatant. Particle size analysis was carried out by using Fritsch Laser particle sizer analysette 22, which is based on LASER diffraction principles. Viscosity was measured by using a rotational viscometer Brookefield DVII PRO+ (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Stoughton, MA, USA). Changes in characteristics of RS, UIS and FS are presented in Table 3.

3. Results and Discussion

3.1. DEHP and its metabolites in raw and pre-treated sludges

The concentrations of four toxic compounds detected in RS, UIS and FS are shown in Table 3. The concentration of DEHP observed in RS was 31.4 mg kg⁻¹, which increased to 37.8 mg kg⁻¹ in UIS and decreased to 26.22 mg kg⁻¹ in FS. The same trend was observed for concentration of 2-ethylhexanoic acid, meaning highest concentration of the acid was 39.3 mg kg⁻¹ in UIS, followed by 28.8 mg kg⁻¹ in RS and 25.1 mg kg⁻¹ in FS. Both 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal were detected at minor concentrations in RS, UIS and FS. Of these, the concentration of 2-ethylhexanol was 0.4, 1.1 and 0.29 mg kg⁻¹ and for 2-ethylhexanal was 0.22, 0.008 and 0.03 mg kg⁻¹ were observed in RS, UIS and FS, respectively. The presence of DEHP - derivative products in the sludge gave the evidence that DEHP degradation could partially occur in the biofiltration system (secondary treatment) of the wastewater treatment plant in which sludge was sampled. Oliver *et al.* (2007) demonstrated that the biofilm formed from microorganisms can metabolize phthalates due to the presence of DEHP - degrading microbes. According to the authors, 55.7% DEHP was removed by the microorganisms which were dominant in the trickling filters. As shown in Table 4, the concentrations of the compounds appeared to be highest in UIS, followed by RS and FS. During ultrasonication, hydroshear forces produced from cavitation of bubble make sludge flocs disintegrate, thus cleaving strong bonds of organic compounds present in the sludge matrix (Marttinent *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2009). As a result, the phthalate and its metabolites sorbed on sludge particulate were transferred to the aqueous phase. This diffusion of the compounds enhanced the efficiency of extraction with organic solvent, leading to detection of higher concentrations of the toxic compounds in UIS compared to RS and FS. The observation of DEHP

concentration in ultrasonicated sludge was found to be different from the studies of Yim *et al.* (2002) and Psillakis *et al.* (2004) on sonochemical degradation of phthalate esters in which ultrasonication treatment was found to be capable of removing DEHP and other phthalates. However, the frequency applied in their study was much higher (80 and 200 kHz) than this study (20 kHz). Thus this ultrasonic frequency is high enough to produce hydroxylation and thermal decomposition of degradation of phthalate. It was observed that DEHP, 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanal and 2-ethylhexanoic acid decreased by 31, 28.7 and 36%, respectively, in FS. This reduction was attributed to an oxidative degradation employing hydroxyl radicals known as a powerful oxidation agent produced in Fenton reaction (Yang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). In addition, under extremely acidic pH, sludge components were decomposed, thus leading to discharge of organic substances from sludge and thus become susceptible to the oxidative degradation (Pham *et al.*, 2010). Thus, phthalate and its metabolites were available in liquid phase to be partially oxidized or mineralized with the hydroxyl radicals. In addition, the availability of the remaining of the compounds in sludge could enhance extraction effect in detection steps, such as ultrasonication mentioned above.

3.2. Effect of pre-treatment on DEHP degradation in aerobic digestion

The removal of DEHP and 2-ethylhexanoic acid in digested sludges were calculated and are presented in Fig 1. The mass removals of DEHP and its metabolites were calculated taking into account the decrease in TS of sludges after 20-day aerobic digestion. The concentrations of DEHP and 2-ethylhexanoic acid in digested sludges were observed to be less pronounced compared to the sludges prior to aerobic degradation. Meanwhile, 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal were not detected in all raw and pre-treated sludges after the aerobic degradation.

DEHP removal was 72, 89, and 85%, respectively, for RS, UIS and FS after degradation. The removals of 2-ethylhexanoic acid were found to be 71, 84, and 79% for RS, UIS and FS, respectively. The reduction of DEHP after aerobic degradation was in agreement with previous studies. Roslev *et al.* (2007) reported that the overall microbial degradation of DEHP was estimated to be 81% in a full scale activated sludge wastewater treatment plant with biological removal of nitrogen and phosphorus. Marttinen *et al.* (2004) reported that DEHP removal was 62% in the degradation of sewage sludge by aeration at 20°C for 28 days.

As mentioned in Fig 2, in aerobic degradation, DEHP could undergo the hydrolysis of ester-bond (de-esterification), producing mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and corresponding alcohol, 2-ethylhexanol (Staple *et al.*, 1997; Nalli *et al.*, 2006). In this case, MEHP was subsequently hydrolysed (dealkylation/de-esterification) into phthalic acid and finally could have undergone a cleavage of aromatic ring into acetyl CoA and succinate through potocatechuate pathway (Staple *et al.*, 1997; Quan *et al.*, 2005). Meanwhile, 2-ethylhexanal underwent the oxidation pathway, leading to accumulation of 2-ethylhexanal and subsequent 2-ethylhexanoic acid (Gavala *et al.*, 2003; Nalli *et al.*, 2006). The microbial enzymes responsible for the DEHP degradation mechanisms were classified as hydrolases, esterases, oxidases, dehydrogenase, (Barnabé *et al.*, 2009). These enzymes were found to be produced from the indigenous flora of sludge. It was noteworthy that lipase having an ester hydrolysis activity was demonstrated to be the most active enzyme in aerobic activated sludge (Gavala, *et al.*, 2003; Nakymya *et al.*, 2005). According to the analysis, both 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal were not presented in all digested sludges. It was suggested that certain amounts of these compounds were oxidized to 2-ethylhexanoic acid in aerobic conditions. The rest could be volatilized during 20 days of the digestion, since 2-ethylhexanol and

2- ethylhexanal have high volatility of 48 and 200 Pa at 20°C, respectively (Nalli *et al.*, 2006). Both 2- ethylhexanol and 2- ethylhexanal were observed in high amounts in the gas phase of DEHP-degradation by *Rhodococcus rhodochrous*, soil-microorganisms in the study of Nalli *et al.* (2006). 2-ethylhexanoic acid was observed to be resistant to further *Rhodococcus rhodochrous* – based degradation in the same studies. However, 2- ethylhexanoic acid was demonstrated to be readily biodegradable in several biodegradability tests (Staples *et al.*, 2001). In addition, 2- ethylhexanoic acid was observed to be significantly reduced in this study, showing that the mixture of microorganisms in the sludge was capable of degrading this compound. There were many aerobic bacteria strains isolated from sludge sample capable of metabolizing the phthalate as carbon source (Olivier *et al.*, 2007; Nakamiya *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007). Obviously, the metabolism of phthalate appeared to be more efficient from a mixed microbial population than an individual microorganism (Staples *et al.*, 1997; Roslev *et al.*, 2007).

The reduction of DEHP in UIS and FS was more pronounced compared to RS, showing the role of pre-treatment on facilitating the DEHP biodegradation. Sludge disintegration with ultrasonication and Fenton oxidative decomposition affected physicochemical changes of sludge, facilitating microbial degradation of the toxic compounds. The pre-treatment processes modified sludge characteristics, causing sludge particle size reduction and weakened floc strength as shown in Table 3. This led to reduction in the sorption of phthalate on sludge particles and increased the phthalate in the dissolved form which was available for microbial phthalate-degraders (Marttinen *et al.*, 2003; Fountoulakis *et al.*, 2006). Ultrasonication and Fenton oxidation improved the phthalate degradation, i.e. enhancement of mass and oxygen

transfer during aerobic degradation since the pre-treatment caused decline in sludge viscosity and increase in solubilization (Pham *et al.*, 2010).

3.3. Effect of pre-treatment on DEHP degradation during Bt-fermentation

The concentrations of DEHP and its metabolites measured at the beginning (0 h) and the end (48 h) of Bt fermentation of WWS are shown in Table 4. The concentrations of DEHP, 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal decreased moderately during Bt fermentation, while the concentration of 2-ethylhexanoic acid increased for all fermented sludges of RS, UIS and FS. The changes in the concentrations of the phthalate and the metabolites expressed the degradation of the compounds by Bt during fermentation. The degradation could be attributed to the activity of enzymatic system produced by Bt during fermentation. DEHP decomposition by yeast esterase has been already reported by Kim *et al.* (2003). In addition, the production of esterase by Bt was found by Brar *et al.* (2009) studying DMP degradation during Bt fermentation. Thus, esterase was probably one of enzymes that were responsible for biodegradation of the phthalate in the present study. The metabolic intermediates of biodegradation of DEHP, i.e. 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal were found in lower concentration in all sludges which were further reduced during fermentation. This reduction could be explained by the biodegradation as well as evaporation during Bt fermentation as it happened during the digestion of WWS by aeration as discussed earlier. Meanwhile, the concentration of 2-ethylhexanoic acid increased in all three sludges after the fermentation. This could result from the oxidation of 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal produced from the de-esterification of DEHP leading to the accumulation of the acid as discussed earlier. This accumulation of the acid confirmed that Bt was not capable of degrading the acid.

Fig 3 presents the maximum Bt cells obtained along with the percentage of DEHP removal in mass after Bt fermentation of raw and pre-treated sludges. As shown in the Fig 3, the percentage DEHP removal in pre-treated sludges was observed to be higher than the raw sludge. The number of Bt cells produced during the fermentation of pre-treated sludges were higher than the raw sludge. The pre-treatment processes, i.e., ultrasonication and Fenton oxidation have positively influenced Bt growth and DEHP biodegradation during fermentation. Ultrasonication and Fenton oxidation increased the biodegradability of WWS (shown in Table 3), thus leading to increase in Bt growth (Pham *et al.*, 2010). The pre-treatment also enhanced the bioavailability of phthalate for degrading microorganisms (Barnabé *et al.*, 2009). Therefore, the improvement of DEHP degradation in pre-treated sludges could be explained by the high accessibility of phthalate to Bt bacteria during fermentation. Higher percentage of DEHP degradation was obtained for UIS (40%) followed by FS (30%) and RS (21%). Meanwhile Bt growth was maximum for FS (1.63×10^9 CFU mL⁻¹) followed by UIS (4.08×10^8 CFU mL⁻¹) and RS (1.44×10^8 CFU mL⁻¹). Thus, DEHP degradation of Bt did not depend on the cell count of Bt cells, but depended on the bioavailability of DEHP. Compared to Fenton oxidation, ultrasonication was reported to be capable of releasing more organic compounds from the adsorption of WWS due to the disintegration of sludge flocs and cell lysis (Pham et al, 20010). DEHP degradation of Bt will be carried out in synthetic medium in the future to study the mechanism of degradation.

4. Conclusions

- DEHP and 2-ethylhexanoic acid were observed at high concentrations ranging of 26.22-37.8 and 25.1-39.3 mg kg⁻¹, respectively, meanwhile 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanal were observed at lower concentration ranging of 0.29-1.1 and 0.008-0.22 mg kg⁻¹, respectively, in RS, UIS and FS.
- After 20-day aerobic digestion, DEHP removal was 72, 89, and 85 %, and 2-ethylhexanoic acid removal was 71, 84, 79 %, respectively, for RS, UIS and FS.
- Bt was found to degrade DEHP, leading to DEHP removal of 21, 40, and 30% for RS, UIS and FS. Meanwhile, 2-ethylhexanoic acid was found to be resistant to degradation during sludge fermentation.
- Ultrasonication and Fenton oxidation were found to play a critical role in the improvement of bioavailability of the compounds for microbial indigenous flora in digestion and during Bt fermentation of sludge.

Thus, both WWS aerobic stabilization and Bt-based production of value-added products from WWS can be applied without concern of DEHP accumulation. The removal of DEHP during sludge treatment and sludge value-addition would be further enhanced by pre-treatment processes.

Acknowledgements

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grants A4984, STP235071, Canada Research Chair), NSERC (DG) and INRS-ETE for financial support. The views or opinions expressed in this article are those of the authors and should not be construed as opinions of the U.S. Environmental Protection Agency.

Appendix

Abbreviations

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DEHP	Bis(2-ethylhexyl) phthalate
FS	Fenton oxidized sludge
EDCs	Endocrine disrupting compound
GC/MS	Gas chromatography/mass spectrometry
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MEHP	Mono-(2-ethylhexyl) phthalate
RS	Raw sludge
SCOD	Soluble chemical oxygen demand
SIM	Selected ion monitoring
SS	Suspended solids
TCOD	Total chemical oxygen demand
TS	Total solids
VAPs	Value added products
UIS	Ultrasonicated sludge
WWS	Wastewater sludge

References

- Abad E., Martinez K., Planas C., Palacios O., Caixach J., Rivera J., 2005. Priority organic pollutant assessment of sludges for agricultural purposes. *Chemosphere* 61, 1358-69.
- Alatrisme-Mondragona F., Iranpourb R., Ahring B. K., 2003. Toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate on the anaerobic digestion of wastewater sludge. *Water Research* 37, 1260-69.
- Amir S., Hafidi M., Merlina G., Hamdi H., Jouraiphy A., El Gharous M., Revel J.C., 2005. Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges. *Process Biochemistry* 40, 2183-90.
- APHA, AWWA and WEF, 2005. Standard methods for the examination of water and Wastewater, 21st Edition.
- Barnabé S., Brar S.K., Tyagi R.D., Beauchesne I., Surampalli R.Y., 2009. Pre-treatment and bioconversion of wastewater sludge to value-added products - Fate of endocrine disrupting compounds. *Science of the Total Environment* 407, 1471-88.
- Barnabé S., Yan S., Tyagi R.D., 2007. Fate of toxic organic compounds during bioconversion of wastewater sludge to value added products. *Proceedings of IWA conference on Moving Forward: Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial, and Public Synergy*. New Brunswick, Canada.
- Bernal-Martinez A., Carrere H., Patureau D., Delgenes J.P., 2007. Ozone pre-treatment as improve of PAH removal during anaerobic digestion of urban sludge. *Chemosphere* 68(6),1013-9.
- Bougrier C., Albasi C., Delgenès J.P., Carrère H., 2006. Effect of ultrasonic, thermal and ozone pre-treatments on waste activated sludge solubilisation and anaerobic biodegradability. *Chemical Engineering and Processing* 45, 711-718.

- Brar S. K., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y., 2009. Concurrent degradation of dimethyl phthalate (DMP) during production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Journal of Hazardous Materials* 171, 1016-23
- Carballa M., Manterola G., Larrea L., Ternes T., Omil F., Lema J. M., 2007. Influence of ozone pre-treatment on sludge anaerobic digestion: Removal of pharmaceutical and personal care products. *Chemosphere* 67, 1444-52.
- CEC, 2000. Working document on sludge—3rd draft. Commission of the European Communities Directorate-General Environment, ENV.E.3/LM, Brussels, 27 April 2000.
- Chang B.V., Wang T.H., and Yuan S.Y., 2007. Biodegradation of four phthalate esters in sludge. *Chemosphere* 69, 1116-23.
- Chen C., Wu P., Chung Y.-C., 2009. Coupled biological and photo-Fenton pretreatment system for the removal of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from water. *Bioresource Technology* 100, 4531-4534.
- El-Hadj T. B., Dosta J., Mata-Álvarez J., 2006. Biodegradation of PAH and DEHP micro-pollutants in mesophilic and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Water Science and Technology* 53 (8), 99-107.
- Fountoulakis M. S., Stamalelatou K., Batstone D. J., Lyberatos G., 2006. Simulation of DEHP biodegradation and sorption during the anaerobic digestion of secondary sludge. *Water Science and Technology* 54 (4), 119-126.
- Gavala H.N., Yenal U., Ioannis V. S., Westermann P., Ahring B.K., 2003. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of the pretreatment at 70 °C. *Water Research* 37, 4561-72.

- Gavala. H. N., Yenal U., and Ahring B.K., 2004. Thermal and enzymatic pre-treatment of sludge containing phthalate esters prior to mesophilic anaerobic digestion. *Biotechnology and bioengineering* 85 (5), 561-567.
- Gómez-Henz A., Aguilar-Caballos M.P., 2003. Social and economic interest in the control of phthalic acid esters. *Trends in Analytical Chemistry* 22(11), 848-857.
- Horn O., Nalli S., Cooper D.,_and Jim N., 2004. Plasticizer metabolites in the environment. *Water Research* 38, 3693–98.
- Kim Y.-H., Lee J., Moon S.-H., 2003. Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* Cutinase. *Applied Microbiology Biotechnology* 63, 75-80.
- Kitis M., Adams C. D., Daigger G. T., 1999. The effects of Fenton's reagent pre-treatment on the biodegradability of non-ionic surfactants. *Water Research* 33 (11), 2561-68.
- Marttinen S. K., Hänninen K., Rintala J. A., 2004. Removal of DEHP in composting and aeration of sewage sludge. *Chemosphere* 54, 265-272.
- Marttinen S. K., Kettunenb R. H., Rintala J. A., 2003. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. *The Science of the Total Environment* 301, 1-12.
- Nakamiya K., Hashimoto S., Ito H., Edmonds J. S., Yasuhara A., Morita M., 2005. Microbial treatment of Bis (2-ethylhexyl) phthalate in Polyvinyl Chloride with isolated bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99 (2), 115-119.
- Nalli S., Cooper D.G., Nicell J.A., 2006. Metabolites from the biodegradation of di-ester plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Science of Total Environment* 366, 286-294.

- Oliver Roly, May Eric, Williams J., 2007. Microcosm investigations of phthalate behaviour in sewage treatment biofilms. *Science of the Total Environment* 372, 605-614.
- Pakou C., Kornaros M., Stamatelatou K., Lyberatos G., 2009. On the fate of LAS, NPEOs and DEHP in municipal sewage sludge during composting. *Bioresource Technology* 100, 1634-42.
- Pham, T.T.H., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2009. Ultrasonification of wastewater sludge - Consequences on biodegradability and flowability. *Journal of Hazardous Materials* 163, 891-898.
- Pham, T.T.H., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Optimization of Fenton oxidation pre-treatment for *B. thuringiensis* – based production of value added products of wastewater sludge. *Journal of Environmental Management* 91, 1657-64.
- Protocole pour la validation d'une methode d'analyse en chimie. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. DR-12-VMC Édition : 9 juin 2009.
- Psillakis E., Mantzavinos D., and Kalogerakis N., 2004. Monitoring the sonochemical degradation of phthalate esters in water using solid-phase microextraction. *Chemosphere* 54, 849-857.
- Quan C. S., Liu Q., Tian W. J., Kikuchi J., and Fan S. D., 2005. Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology* 6 (66), 702-710.
- Roslev P., Vorkamp K., Aarup Jakob, Frederiksen K., Nielsen P. H., 2007. Degradation of phthalate esters in an activated sludge wastewater treatment plant. *Water Research* 41, 969-976.

- Scrimshaw M. D, Lester J.N., 2003. Fate and behaviour of endocrine disrupters in sludge treatment and disposal. In: Birkett J.W., Lester J.N., editors. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. London: CRC Press LLC and IWA publishing, pp. 145-176.
- Staples C. A., Peterson D. R., Parkerton T. F., Adams W. J., 1997. The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere* 35 (4), 667-749.
- Staples C., 2001. A review of environmental fate and aquatic effects of a series of C4 and C8 oxo-process chemicals. *Chemosphere* 45, 339-346.
- Vidyarthi A.S., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y., 2002. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material, *Water Research* 36, 4850–60.
- Yang G.-P., Zhao X.-K., Sun X.-J., Lu X.-L., 2005. Oxidative degradation of diethyl phthalate by photochemically-enhanced Fenton reaction. *Journal of Hazardous Materials B126*, 112–118.
- Yezza A., Tyagi R. D., Valéro J. R. and Surampalli R. Y., 2005. Wastewater sludge pre-treatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. *World of Microbiology & Biotechnology* 21, 1165-74.
- Yim B., Nagata Y., Maeda Y., 2002. Sonolytic degradation of phthalic acid esters in aqueous solutions. Acceleration of hydrolysis by sonochemical action. *J. Physical Chemistry A* 106: 104-107.

Table 1 Selected ions for the SIM mode detection

Compound	Retention time (min)	Selected ions (<i>m/z</i>)
DEHP	17.25	57; 69; 149 [*] ; 167
2-ethylhexanol	5.80	57; 70 [*] ; 83
2-ethylhexanal	5.09	57; 72 [*] ; 85
2-ethylhexanoic acid	6.72	57; 73 [*] ; 87; 100
n-pentadecane	10.39	57; 71 [*] ; 85

* Ions used for quantification

Table 2 Limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), ratio conformity and recovery of the compounds from sewage sludge

Compound	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg dm}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg dm}$)	Ratio of conformity	Recovery (%)
DEHP	14.84	53	9	85
2-ethylhexanol	19.08	63.6	9	76
2-ethylhexanal	16.96	57.27	8	78
2-ethylhexanoic acid	15.05	50.4	6	82

Table 3 Concentration of DEHP and its degradation products in different sludges along with characteristics of the sludges

	Raw sludge	Ultrasonicated sludge	Fenton oxidized sludge
DEHP (mg/kg)	31.4 ± 0.3	37.8 ± 0.9	26.22 ± 0.4
2-ethylhexanol (mg/kg)	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.29 ± 0.01
2-ethylhexanal (mg/kg)	0.22 ± 0.05	0.008	0.03
2-ethylhexanoic acid (mg/kg)	28.8 ± 0.5	39.3 ± 0.7	25.1 ± 1
TS (g/L)	25	25	25
pH	5.7	5.7	4.3
^a Median particle size	43	13	54
^b Compactness degree	1.6	1.5	1.3
Apparent viscosity (mPa.s)	79	73	40
TCOD (mg/L)	110 956	110 956	106 518
^c Solubilization (%)	60	75	65
^d Biodegradability (%)	64	77	73

^a diameter 50 % size distribution cut-off points

^b fractal dimension index estimated from the slope of log10 plot of limiting viscosity (η_{∞}) versus TS concentration ($\eta_{\infty} \approx TS^{1/(3-D_f)}$)

^c SCOT/TCOD

^d percentage of TS consumption during 20-day aerobic degradation

Table 4 Fate of DEHP and its metabolites during Bt-fermentation

	RS		UIS		FS	
	0h	48h	0h	48h	0h	48h
DEHP (mg/kg)	31.5 ± 1.2	24.2 ± 1.6	36.6 ± 1.8	22.8 ± 0.3	25.6 ± 0.5	19.3 ± 0.9
2-ethylhexanol (mg/kg)	0.4 ± 0.03	0.048	1.01 ± 0.09	0.552 ± 0.02	0.39 ± 0.08	0.27 ± 0.01
2-ethylhexanal (mg/kg)	0.20 ± 0.02	0.048	0.008	-	0.048	0.008
2-ethylhexanoic acid (mg/kg)	27.7 ± 1.9	29.8 ± 0.9	38.8 ± 1.3	36.9 ± 1.4	25.3 ± 0.6	25.7 ± 0.5

RS, UIS, FS referred to raw, ultrasonicated and Fenton oxidized sludges

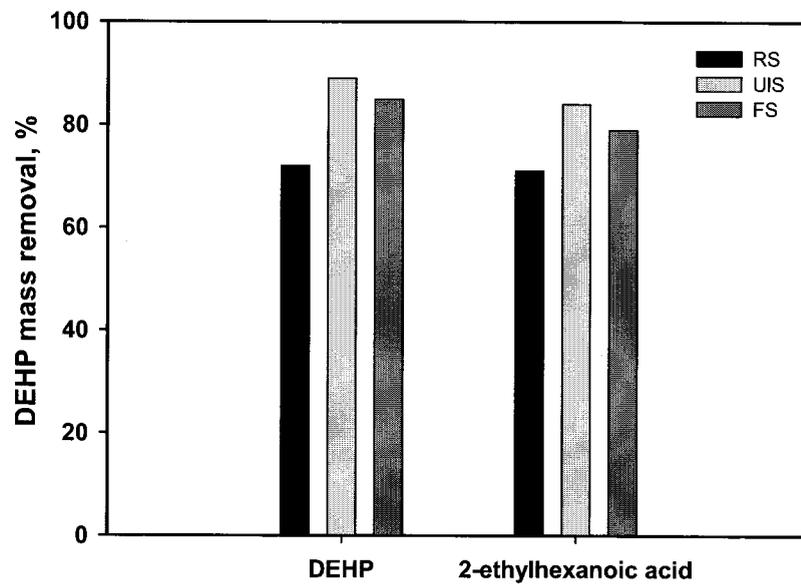


Figure 1 Removal of DEHP and 2-ethylhexanoic acid calculated as mass during aerobic digestion (20 days of incubation time)

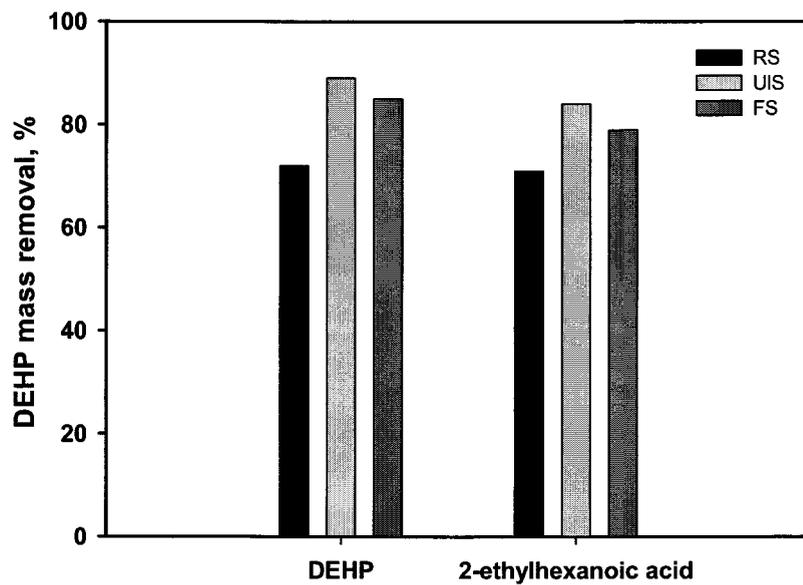


Figure 2 Removal of DEHP and 2-ethylhexanoic acid calculated as mass during aerobic digestion (20 days of incubation time)

CHAPITRE 5 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Ce travail démontre que l'ultrasonification et l'oxydation Fenton peuvent être appliqués comme prétraitement pour améliorer la biodégradabilité des boues d'épuration et la production subséquente de produits à valeur ajoutée. Ces prétraitements permettent également d'améliorer l'enlèvement du bis (2-éthylhexyle) durant la stabilisation des boues et la production à valeur ajoutée. Au total, ce travail a permis de réaliser quatre articles scientifiques publiés.

5.1. Conclusions

5.1.1. *Augmentation de la biodégradabilité des boues*

L'étude sur l'effet de l'ultrasonification et l'oxydation Fenton sur la bioconversion des boues en des produits à valeur ajoutée a conduit aux conclusions suivantes :

- L'ultrasonification et l'oxydation Fenton ont modifié de propriétés physico-chimiques des boues d'épuration, soit la diminution de la viscosité et la taille des particules, et l'affaiblissement de la structure des floes, entraînant l'amélioration du transfert d'oxygène dans la biodégradation.
- L'ultrasonification et l'oxydation Fenton ont amélioré la production de biopesticides dans des boues d'épuration en augmentant la croissance et la sporulation de Bt lors de sa culture dans des boues.

5.1.2. *L'enlèvement du DEHP*

L'étude de la présence de DEHP et ses métabolites pendant le prétraitement, la digestion aérobie et la fermentation de *Bacillus thuringiensis* a conduit aux conclusions suivantes :

- L'ultrasonification et l'oxydation Fenton ont réduit la concentration en DEHP dans les boues d'épuration.
- L'ultrasonification et l'oxydation Fenton ont amélioré la biodisponibilité du DEHP pour la biodégradation du DEHP par des micro-organismes.
- Les microorganismes indigènes présents dans les boues d'épuration sont responsables de la dégradation du DEHP dans la digestion aérobie,

Bacillus thuringiensis, une excellente « productrice à valeur ajoutée », est capable de dégrader le DEHP.

5.1.3. Modification des caractères rhéologiques des boues

L'étude sur l'influence de l'ultrasonification et de l'oxydation Fenton sur les caractères rhéologiques des boues d'épuration a conduit aux conclusions suivantes:

- L'oxydation Fenton a augmenté la filtrabilité des boues en raison de réaggrégation des particules des boues. Également, l'ultrasonification a détérioré la filtrabilité en raison de diminution de la taille des particules. Ainsi, l'oxydation Fenton peut être utilisée pour la déshydratation des boues pour leur élimination éventuelle.
- L'ultrasonification et l'oxydation Fenton ont amélioré la fluidité des boues due à la réduction de pseudoplasticité des boues. Cela facilite la gestion des boues (transport, mélange, aération, etc.).

5.2. Recommandations

5.2.1. Prétraitement

Ce travail a porté sur l'étude de prétraitement individuel, soit l'ultrasonification comme méthode physique et l'oxydation Fenton comme méthode chimique. La combinaison de procédés de prétraitement pourrait donner de meilleurs résultats sur l'amélioration de la biodégradabilité des boues d'épuration. Il est recommandé de :

- Combiner l'ultrasonification et l'oxydation Fenton : ultrasonification-oxydation Fenton; oxydation Fenton-ultrasonicaïton.
- Étudier la photo-oxydation Fenton avec la lumière UV.

5.2.2. Obtention de produits à valeur ajoutée

L'ultrasonification et l'oxydation Fenton accroissent la croissance et la sporation de Bt lors de sa culture dans des boues d'épuration. Cependant, les expériences ont été réalisées en fioles Erlenmeyer. Pour bien évaluer l'amélioration de la production de produits à valeur ajoutée à base de Bt, la fermentation de Bt dans un fermenteur avec un système de contrôle est nécessaire. Il est recommandé de :

- Réaliser la fermentation de Bt en fermenteur avec des conditions contrôlées en utilisant boues non traitées et traitées comme substrat.
- Réaliser des bioessais des bouillons fermentés afin d'évaluer le potentiel d'entomotoxicité pour la production des biopesticides

À part Bt, d'autres micro-organismes industriels sont capables de produire des produits à valeur ajoutée en utilisant des boues d'épuration comme matière première. C'est le cas de l'agent de biocontrôle *Trichoderma viride* et de l'inoculant microbien *Sinorhizobium meliloti*. Certaines méthodes de prétraitement sont efficaces pour améliorer le rendement de ces productions dont les traitements acide, alcaline et thermo alcalin ainsi que les traitements par oxydation. Il est recommandé d'évaluer l'effet des ultrasons et de l'oxydation Fenton sur l'amélioration de la production de produits à valeur ajoutée basés sur ces micro-organismes.

5.2.3. Biodégradation du DEHP dans les boues

Ce projet portait particulièrement sur l'enlèvement du DEHP dans les boues d'épuration pendant le prétraitement, la digestion aérobie et la fermentation de Bt. Il a été démontré que Bt est capable de dégrader le DEHP dans les boues. Une étude plus poussée sur le mécanisme de dégradation de Bt du DEHP est recommandée :

- Réaliser une fermentation de Bt dans un milieu synthétique ainsi que des boues brutes et prétraitées dopés avec différentes concentrations de DEHP pour déterminer l'utilisation du DEHP comme source unique de carbone de Bt et l'étude de la cinétique de dégradation du DEHP par Bt.
- Mesurer les activités des enzymes au cours de la fermentation de Bt pour déterminer lesquelles sont responsables de la dégradation de DEHP.

ANNEXES

ANNEXE I
OPTIMIZATION OF FENTON OXIDATION PRE-TREATMENT FOR *B.*
***THURINGIENSIS* – BASED PRODUCTION OF VALUE ADDED**
PRODUCTS FROM WASTEWATER SLUDGE

Table 1 Variation of (a) viable cell and; (b) spore count during *Bacillus thuringiensis* growth in raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS), and Fenton oxidized sludge (FS).

Time	RS		UIS		FS	
	Cell	Spore	Cell	Spore	Cell	Spore
0	7.10E+05		7.10E+05		7.10E+05	
3	7.40E+05		1.10E+06		3.20E+06	
6	1.00E+06		7.00E+06		1.00E+07	
9	3.50E+06	8.60E+04	2.60E+07		3.88E+07	7.20E+05
12	6.00E+06	1.30E+06	4.00E+07		1.38E+08	1.36E+06
15	1.32E+07	1.61E+06	1.00E+08	3.34E+06	1.60E+09	5.00E+06
18	2.42E+08	3.22E+06	2.42E+08	5.72E+06	2.37E+09	1.62E+07
21	4.00E+08	1.82E+08	6.20E+08	1.18E+07	5.10E+09	1.28E+08
24	6.00E+08	5.00E+08	1.23E+09	1.09E+08	6.87E+09	4.68E+08
27	6.20E+08	5.40E+08	1.66E+09	3.64E+08	6.50E+09	9.80E+08
30	7.20E+08	5.90E+08	1.04E+09	5.30E+08	8.13E+09	1.82E+09
36	5.80E+08	5.56E+08	8.80E+08	4.70E+08	4.30E+09	2.11E+09
48	5.00E+08	5.20E+08	1.08E+09	7.60E+08	3.84E+09	3.90E+09
72	5.28E+08	5.40E+08	9.30E+08	7.80E+08	3.00E+09	3.38E+09

ANNEXE II
INFLUENCE OF ULTRASONIFICATION AND FENTON OXIDATION
PRE-TREATMENT ON RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
WASTEWATER SLUDGE

Table 1a Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 10 g/L

SR (s ⁻¹)	RS		UIS		FS	
	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)
0.08	137.97	0.12	57.99	0.05	0.00	0.00
0.17	75.98	0.13	33.99	0.06	0.00	0.00
0.42	42.79	0.18	20.00	0.08	0.00	0.00
0.84	20.19	0.17	12.40	0.10	20.00	0.17
1.68	12.70	0.21	8.60	0.14	0.00	0.00
2.52	10.26	0.26	6.33	0.16	13.33	0.34
3.36	9.10	0.31	5.15	0.17	15.00	0.50
4.20	8.28	0.35	4.40	0.18	12.00	0.50
5.60	7.29	0.41	3.90	0.22	21.00	1.18
7.00	6.84	0.48	3.50	0.25	16.80	1.18
8.40	6.30	0.53	3.22	0.27	16.00	1.34
9.80	5.90	0.58	3.02	0.30	13.71	1.34
11.20	5.55	0.62	2.91	0.33	12.00	1.34
12.60	5.28	0.66	2.80	0.35	10.66	1.34
14.00	5.09	0.71	2.74	0.38	9.60	1.34
15.40	4.90	0.75	2.68	0.41	8.73	1.34
16.80	4.72	0.79	2.61	0.44	8.00	1.34
18.20	4.57	0.83	2.57	0.47	7.38	1.34
19.60	4.44	0.87	2.53	0.50	6.86	1.34
21.00	4.32	0.91	2.52	0.53	7.20	1.51
22.40	4.20	0.94	2.47	0.55	6.75	1.51
23.80	4.09	0.97	2.42	0.58	6.35	1.51
25.20	3.99	1.00	2.39	0.60	5.33	1.34
26.60	3.91	1.04	2.37	0.63	5.05	1.34
28.00	3.83	1.07	2.35	0.66	4.80	1.34
29.40	3.75	1.10	2.33	0.68	4.00	1.18
30.80	3.69	1.14	2.30	0.71	3.27	1.01
32.20	3.66	1.18	2.28	0.74	3.65	1.18
33.60	3.65	1.23	2.30	0.77	3.00	1.01
35.00	3.64	1.27	2.34	0.82	2.40	1.01
36.40	3.62	1.32	2.39	0.87	2.77	1.01
37.80	3.59	1.36	2.43	0.92	2.67	1.01
39.20	3.57	1.40	2.47	0.97	2.14	1.01
40.60	3.55	1.44	2.50	1.01	2.07	0.84
42.00	3.52	1.48	2.52	1.06	2.00	0.84
43.40	3.48	1.51	2.55	1.11	1.94	0.84
44.80	3.48	1.56	2.56	1.15	1.87	0.84
46.20	3.46	1.60	2.59	1.20	2.18	0.84

Table 1b Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 20 g/L

SR (s ⁻¹)	RS		UIS		FS	
	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)
0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.84	20.00	0.17	59.99	0.50	59.99	0.50
1.68	29.99	0.50	49.99	0.84	39.99	0.67
2.52	59.99	1.51	46.66	1.18	53.32	1.34
3.36	54.99	1.85	39.99	1.34	49.99	1.68
4.20	59.99	2.52	39.99	1.68	47.99	2.02
5.60	56.99	3.19	32.99	1.85	44.99	2.52
7.00	50.39	3.53	28.79	2.02	43.19	3.02
8.40	43.99	3.70	25.99	2.18	37.99	3.19
9.80	42.85	4.20	23.99	2.35	35.99	3.53
11.20	40.49	4.54	21.00	2.35	31.49	3.53
12.60	37.33	4.70	21.33	2.69	31.99	4.03
14.00	34.79	4.87	19.20	2.69	29.99	4.20
15.40	33.81	5.21	18.54	2.86	28.36	4.37
16.80	31.99	5.37	17.00	2.86	27.99	4.70
18.20	30.46	5.54	15.69	2.86	25.84	4.70
19.60	29.14	5.71	14.57	2.86	23.99	4.70
21.00	27.19	5.71	15.20	3.19	23.99	5.04
22.40	26.24	5.88	14.25	3.19	22.50	5.04
23.80	24.70	5.88	12.70	3.02	21.17	5.04
25.20	23.99	6.05	12.66	3.19	20.00	5.04
26.60	23.36	6.21	12.63	3.36	18.94	5.04
28.00	22.80	6.38	11.40	3.19	18.00	5.04
29.40	22.85	6.72	11.43	3.36	17.71	5.21
30.80	22.36	6.89	12.00	3.70	17.45	5.37
32.20	21.91	7.05	10.95	3.53	15.65	5.04
33.60	21.50	7.22	11.00	3.70	15.50	5.21
35.00	20.64	7.22	10.56	3.70	14.88	5.21
36.40	20.30	7.39	10.15	3.70	14.30	5.21
37.80	20.00	7.56	9.78	3.70	13.77	5.21
39.20	19.71	7.73	9.43	3.70	12.85	5.04
40.60	19.03	7.73	9.52	3.86	12.41	5.04
42.00	18.40	7.73	9.20	3.86	12.00	5.04
43.40	18.19	7.89	8.36	3.53	11.22	4.87
44.80	17.62	7.89	8.25	3.70	10.87	4.87
46.20	17.09	7.89	8.13	3.86	10.54	4.87

Table 1c Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 25 g/L

SR (s ⁻¹)	RS		UIS		FS	
	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)
0.08	599.87	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	299.94	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00
0.42	159.97	0.67	39.99	0.17	39.99	0.17
0.84	119.97	1.01	20.00	0.17	20.00	0.17
1.68	99.98	1.68	29.99	0.50	20.00	0.34
2.52	179.96	4.54	26.66	0.67	20.00	0.50
3.36	199.96	6.72	29.99	1.01	24.99	0.84
4.20	203.96	8.57	39.99	1.68	31.99	1.34
5.60	182.96	10.25	44.99	2.52	32.99	1.85
7.00	163.17	11.42	50.39	3.53	38.39	2.69
8.40	145.97	12.26	59.99	5.04	51.99	4.37
9.80	133.69	13.10	56.56	5.54	51.42	5.04
11.20	124.47	13.94	50.99	5.71	47.99	5.37
12.60	115.98	14.61	49.32	6.21	45.32	5.71
14.00	109.18	15.28	46.79	6.55	41.99	5.88
15.40	102.52	15.79	42.54	6.55	39.26	6.05
16.80	97.98	16.46	41.99	7.05	36.99	6.21
18.20	92.29	16.80	38.76	7.05	35.99	6.55
19.60	88.27	17.30	36.85	7.22	34.28	6.72
21.00	83.98	17.64	34.39	7.22	32.79	6.89
22.40	80.98	18.14	32.99	7.39	31.49	7.05
23.80	76.92	18.31	31.05	7.39	30.35	7.22
25.20	73.98	18.64	30.66	7.73	29.33	7.39
26.60	70.72	18.81	29.05	7.73	27.78	7.39
28.00	68.99	19.32	28.19	7.89	26.99	7.56
29.40	66.27	19.48	26.85	7.89	26.28	7.73
30.80	64.35	19.82	26.18	8.06	25.09	7.73
32.20	63.12	20.32	25.04	8.06	24.52	7.89
33.60	61.49	20.66	23.99	8.06	23.99	8.06
35.00	59.51	20.83	23.04	8.06	23.04	8.06
36.40	58.14	21.16	22.15	8.06	22.61	8.23
37.80	56.88	21.50	21.33	8.06	21.77	8.23
39.20	55.27	21.67	20.57	8.06	20.57	8.06
40.60	53.78	21.84	19.86	8.06	20.69	8.40
42.00	52.79	22.17	19.20	8.06	20.40	8.57
43.40	51.47	22.34	19.35	8.40	19.35	8.40
44.80	50.61	22.68	18.75	8.40	19.12	8.57
46.20	49.81	23.01	18.18	8.40	19.27	8.90

Table 1d Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 30 g/L

SR (s ⁻¹)	RS		UIS		FS	
	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)
0.08	1199.74	1.01	199.96	0.17	399.91	0.34
0.17	599.87	1.01	99.98	0.17	199.96	0.34
0.42	279.94	1.18	119.97	0.50	159.97	0.67
0.84	159.97	1.34	79.98	0.67	139.97	1.18
1.68	129.97	2.18	119.97	2.02	99.98	1.68
2.52	253.28	6.38	146.64	3.70	153.30	3.86
3.36	244.95	8.23	139.97	4.70	139.97	4.70
4.20	227.95	9.57	127.97	5.37	135.97	5.71
5.60	197.96	11.09	110.98	6.21	116.98	6.55
7.00	172.76	12.09	93.58	6.55	103.18	7.22
8.40	153.97	12.93	83.98	7.05	91.98	7.73
9.80	140.54	13.77	75.41	7.39	83.98	8.23
11.20	128.97	14.44	70.49	7.89	77.98	8.73
12.60	121.31	15.28	65.32	8.23	73.32	9.24
14.00	112.78	15.79	61.19	8.57	67.19	9.41
15.40	106.89	16.46	55.62	8.57	64.35	9.91
16.80	99.98	16.80	52.99	8.90	58.99	9.91
18.20	95.06	17.30	48.91	8.90	57.22	10.41
19.60	89.12	17.47	46.28	9.07	53.99	10.58
21.00	84.78	17.80	45.59	9.57	51.99	10.92
22.40	80.98	18.14	43.49	9.74	48.74	10.92
23.80	78.34	18.64	42.34	10.08	46.58	11.09
25.20	75.98	19.15	40.66	10.25	45.32	11.42
26.60	72.62	19.32	38.52	10.25	44.20	11.76
28.00	70.19	19.65	37.79	10.58	41.99	11.76
29.40	67.41	19.82	35.99	10.58	42.28	12.43
30.80	65.44	20.16	34.90	10.75	40.36	12.43
32.20	64.16	20.66	33.91	10.92	38.60	12.43
33.60	61.99	20.83	32.49	10.92	37.99	12.77
35.00	59.99	21.00	30.71	10.75	36.95	12.93
36.40	58.60	21.33	29.53	10.75	35.99	13.10
37.80	57.32	21.67	28.88	10.92	34.66	13.10
39.20	55.70	21.84	27.85	10.92	33.42	13.10
40.60	54.20	22.00	26.89	10.92	32.68	13.27
42.00	52.79	22.17	25.99	10.92	31.99	13.44
43.40	51.86	22.51	25.16	10.92	30.96	13.44
44.80	50.61	22.68	24.74	11.09	30.37	13.61
46.20	49.81	23.01	24.36	11.25	29.45	13.61

Table 1e Viscosity and shear stress (SS) vs. shear rate (SR) profiles of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 40 g/L

SR (s ⁻¹)	RS		US		FS	
	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)	Viscosity (mPa s)	SS (Pa)
0.08	1399.70	1.18	599.87	0.34	399.91	0.34
0.17	799.83	1.34	199.96	0.50	199.96	0.34
0.42	399.91	1.68	159.97	0.67	199.96	0.84
0.84	299.94	2.52	139.97	1.18	159.97	1.34
1.68	289.94	4.87	149.97	2.52	269.94	4.54
2.52	566.55	14.28	286.61	7.22	313.27	7.89
3.36	519.89	17.47	269.94	9.07	264.94	8.90
4.20	463.90	19.48	239.95	10.08	243.95	10.25
5.60	392.92	22.00	209.96	11.76	206.96	11.59
7.00	343.13	24.02	177.56	12.43	184.76	12.93
8.40	303.94	25.53	153.97	12.93	165.96	13.94
9.80	277.66	27.21	138.83	13.61	150.83	14.78
11.20	256.45	28.72	127.47	14.28	137.97	15.45
12.60	238.62	30.07	118.64	14.95	130.64	16.46
14.00	224.35	31.41	112.78	15.79	119.97	16.80
15.40	211.59	32.59	105.80	16.29	113.43	17.47
16.80	199.96	33.59	98.98	16.63	106.98	17.97
18.20	189.19	34.43	94.13	17.13	100.59	18.31
19.60	179.10	35.10	89.12	17.47	95.12	18.64
21.00	170.36	35.78	84.78	17.80	89.58	18.81
22.40	162.72	36.45	80.98	18.14	85.48	19.15
23.80	155.97	37.12	76.92	18.31	82.57	19.65
25.20	149.97	37.79	73.98	18.64	79.32	19.99
26.60	143.97	38.30	70.72	18.81	77.67	20.66
28.00	138.57	38.80	67.79	18.98	74.38	20.83
29.40	133.69	39.30	65.70	19.32	72.56	21.33
30.80	128.70	39.64	63.80	19.65	69.80	21.50
32.20	123.63	39.81	62.07	19.99	67.29	21.67
33.60	119.47	40.14	60.49	20.32	65.49	22.00
35.00	116.14	40.65	58.55	20.49	63.83	22.34
36.40	113.05	41.15	56.76	20.66	62.29	22.68
37.80	109.31	41.32	55.54	21.00	60.43	22.84
39.20	106.26	41.66	53.99	21.16	58.70	23.01
40.60	103.01	41.82	51.71	21.00	57.92	23.52
42.00	100.78	42.33	49.99	21.00	56.39	23.68
43.40	98.30	42.66	49.15	21.33	55.34	24.02
44.80	95.98	43.00	47.61	21.33	53.61	24.02
46.20	93.80	43.33	46.17	21.33	52.72	24.35

Table 2 Thixotropic behaviour of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 25 g/L

Time (min)	Viscosity (mPa s)		
	RS	UIS	FS
6.00	279.94	159.97	119.97
12.00	279.94	159.97	99.98
18.00	259.94	139.97	99.98
24.00	259.94	119.97	99.98
30.00	219.95	119.97	99.98
36.00	219.95	119.97	119.97
42.00	199.96	99.98	119.97
48.00	179.96	99.98	119.97
54.00	179.96	99.98	119.97
60.00	179.96	99.98	119.97
66.00	179.96	99.98	119.97
72.00	179.96	99.98	99.98
78.00	179.96	99.98	99.98
84.00	159.97	99.98	99.98
90.00	159.97	99.98	99.98
96.00	159.97	99.98	99.98
102.00	159.97	99.98	99.98
108.00	159.97	99.98	79.98
114.00	159.97	99.98	79.98

Table 3 Evolution of viscosity as function of solids concentration and pre-treatment processes

TS (g/L)	Viscosity (mPa s)		
	RS	US	FS
10	2.89	2.51	2.69
20	14.85	8.17	4.94
25	78.65	72.90	37.91
30	119.06	98.31	55.82
40	359.76	199.21	108.31

Table 4 Evolution of Power model parameters (consistency and flow index) as a function of solids concentration and pre-treatment processes of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS), and Fenton oxidized sludge (FS)

TS, g/L	<i>K</i>			<i>n</i>		
	RS	UIS	FS	RS	UIS	FS
10	42.4	25.6	52.5	0.5	0.6	0.6
20	114.3	65.2	95.9	0.5	0.6	0.6
25	187.7	92.6	165.4	0.5	0.6	0.6
30	542.4	163.1	221.4	0.4	0.6	0.6
40	1188.0	620.4	317.9	0.4	0.6	0.6

Table 5a Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 10 g/L

Particle size (µm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD	CFD	FD	CFD
0.16	0.01	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02
0.18	0.01	0.01	0.03	0.07	0.02	0.03
0.19	0.01	0.02	0.04	0.10	0.02	0.05
0.20	0.01	0.03	0.04	0.14	0.02	0.07
0.21	0.01	0.04	0.04	0.18	0.02	0.09
0.23	0.01	0.05	0.04	0.22	0.02	0.10
0.24	0.01	0.06	0.05	0.27	0.02	0.12
0.26	0.01	0.07	0.06	0.33	0.02	0.14
0.28	0.01	0.08	0.06	0.39	0.02	0.16
0.30	0.02	0.10	0.07	0.47	0.02	0.18
0.31	0.02	0.11	0.09	0.56	0.02	0.20
0.34	0.02	0.13	0.10	0.66	0.02	0.22
0.36	0.02	0.16	0.12	0.78	0.02	0.24
0.38	0.03	0.18	0.14	0.92	0.02	0.27
0.41	0.03	0.21	0.16	1.08	0.02	0.29
0.44	0.03	0.25	0.18	1.26	0.03	0.32
0.46	0.04	0.29	0.21	1.47	0.03	0.34
0.50	0.04	0.33	0.24	1.71	0.03	0.37
0.53	0.05	0.38	0.26	1.98	0.03	0.40
0.56	0.06	0.44	0.30	2.27	0.03	0.43
0.60	0.06	0.51	0.33	2.60	0.03	0.45
0.64	0.07	0.58	0.36	2.95	0.03	0.48
0.69	0.08	0.65	0.38	3.34	0.03	0.51
0.73	0.08	0.73	0.41	3.75	0.03	0.54
0.78	0.08	0.82	0.43	4.18	0.03	0.57
0.83	0.09	0.90	0.46	4.64	0.03	0.60
0.89	0.09	1.00	0.48	5.12	0.03	0.63
0.95	0.09	1.09	0.51	5.62	0.03	0.66
1.01	0.10	1.19	0.54	6.16	0.03	0.70
1.08	0.10	1.29	0.57	6.73	0.04	0.74
1.15	0.10	1.39	0.59	7.32	0.04	0.78
1.23	0.11	1.50	0.62	7.94	0.04	0.82
1.31	0.11	1.61	0.65	8.60	0.05	0.87
1.40	0.11	1.72	0.68	9.28	0.05	0.92
1.49	0.12	1.84	0.71	9.98	0.05	0.97
1.59	0.12	1.95	0.73	10.71	0.06	1.03
1.70	0.12	2.07	0.75	11.46	0.06	1.09
1.81	0.12	2.20	0.77	12.23	0.06	1.15
1.93	0.13	2.33	0.79	13.01	0.07	1.22
2.06	0.13	2.46	0.81	13.82	0.07	1.29
2.20	0.14	2.60	0.83	14.65	0.07	1.37

Particle size (μm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
2.35	0.14	2.74	0.85	15.50	0.08	1.44
2.50	0.15	2.89	0.87	16.37	0.08	1.52
2.67	0.16	3.05	0.89	17.26	0.08	1.61
2.85	0.17	3.22	0.91	18.17	0.09	1.70
3.04	0.18	3.39	0.94	19.11	0.09	1.79
3.24	0.19	3.58	0.95	20.06	0.10	1.89
3.46	0.20	3.78	0.97	21.03	0.11	2.00
3.69	0.21	3.98	0.99	22.02	0.11	2.11
3.94	0.22	4.20	1.00	23.02	0.12	2.23
4.20	0.23	4.44	1.02	24.04	0.13	2.37
4.48	0.25	4.69	1.04	25.08	0.14	2.51
4.78	0.27	4.96	1.07	26.15	0.15	2.66
5.10	0.29	5.24	1.10	27.25	0.17	2.83
5.44	0.31	5.55	1.14	28.39	0.18	3.01
5.81	0.34	5.89	1.19	29.58	0.20	3.20
6.20	0.37	6.26	1.24	30.82	0.22	3.42
6.61	0.41	6.68	1.30	32.13	0.25	3.67
7.05	0.46	7.14	1.37	33.50	0.28	3.95
7.53	0.52	7.65	1.44	34.94	0.31	4.26
8.03	0.58	8.23	1.52	36.47	0.36	4.62
8.57	0.65	8.89	1.61	38.08	0.41	5.03
9.14	0.74	9.63	1.71	39.78	0.46	5.49
9.75	0.86	10.49	1.82	41.61	0.53	6.03
10.41	1.00	11.49	1.96	43.57	0.62	6.65
11.10	1.16	12.65	2.11	45.67	0.72	7.36
11.84	1.35	14.00	2.27	47.94	0.84	8.20
12.64	1.57	15.57	2.43	50.37	0.98	9.18
13.48	1.80	17.37	2.57	52.94	1.14	10.32
14.39	2.04	19.41	2.70	55.64	1.30	11.62
15.35	2.27	21.67	2.78	58.42	1.48	13.10
16.37	2.47	24.15	2.83	61.25	1.66	14.77
17.47	2.65	26.79	2.83	64.08	1.84	16.61
18.64	2.77	29.57	2.78	66.86	1.99	18.60
19.89	2.84	32.41	2.67	69.53	2.12	20.72
21.22	2.85	35.26	2.52	72.05	2.21	22.93
22.64	2.81	38.08	2.33	74.38	2.26	25.19
24.15	2.73	40.80	2.12	76.51	2.25	27.44
25.77	2.64	43.44	1.93	78.44	2.21	29.65
27.49	2.61	46.05	1.80	80.24	2.21	31.86
29.33	2.64	48.69	1.71	81.95	2.24	34.10
31.29	2.69	51.37	1.61	83.56	2.21	36.31
33.39	2.72	54.09	1.50	85.07	2.04	38.35

Particle size (µm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
35.62	2.74	56.83	1.39	86.46	1.84	40.20
38.01	2.81	59.64	1.31	87.77	1.76	41.95
40.55	2.93	62.57	1.26	89.03	1.84	43.80
43.26	3.09	65.66	1.23	90.27	2.05	45.85
46.16	3.24	68.90	1.19	91.46	2.24	48.09
49.25	3.35	72.25	1.14	92.59	2.31	50.40
52.54	3.44	75.69	1.07	93.66	2.28	52.68
56.06	3.49	79.18	0.98	94.64	2.23	54.91
59.81	3.52	82.70	0.89	95.53	2.21	57.12
63.81	3.47	86.17	0.80	96.32	2.22	59.34
68.08	3.30	89.46	0.70	97.02	2.24	61.57
72.64	3.00	92.46	0.60	97.62	2.28	63.85
77.50	2.54	95.00	0.51	98.13	2.31	66.15
82.68	1.98	96.98	0.42	98.54	2.33	68.48
88.22	1.40	98.38	0.33	98.88	2.34	70.82
94.12	0.87	99.24	0.25	99.13	2.33	73.15
100.42	0.46	99.70	0.19	99.32	2.29	75.44
107.14	0.20	99.90	0.13	99.45	2.21	77.65
114.30	0.07	99.97	0.09	99.53	2.06	79.71
121.95	0.02	99.99	0.06	99.59	1.93	81.64
130.11	0.00	100.00	0.04	99.63	1.82	83.47
138.82	0.00	100.00	0.02	99.65	1.68	85.15
148.11	0.00	100.00	0.02	99.67	1.52	86.67
158.02	0.00	100.00	0.01	99.68	1.39	88.06
168.59	0.00	100.00	0.01	99.68	1.30	89.37
179.87	0.00	100.00	0.01	99.69	1.25	90.62
191.91	0.00	100.00	0.00	99.69	1.22	91.84
204.75	0.00	100.00	0.00	99.70	1.21	93.05
218.45	0.00	100.00	0.00	99.70	1.22	94.27
233.07	0.00	100.00	0.00	99.71	1.23	95.51
248.67	0.00	100.00	0.00	99.71	1.14	96.64
265.31	0.00	100.00	0.01	99.72	0.89	97.54
283.06	0.00	100.00	0.01	99.73	0.62	98.16
302.00	0.00	100.00	0.01	99.74	0.43	98.59
322.21	0.00	100.00	0.02	99.76	0.33	98.91
343.77	0.00	100.00	0.03	99.78	0.26	99.18
366.77	0.00	100.00	0.04	99.83	0.21	99.38
391.32	0.00	100.00	0.05	99.88	0.16	99.55
417.50	0.00	100.00	0.05	99.94	0.14	99.69
445.44	0.00	100.00	0.04	99.98	0.15	99.84
475.24	0.00	100.00	0.02	100.00	0.16	100.00

Table 5b Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 20 g/L

Particle size (μm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD	CFD	FD	CFD
0.16	0.01	0.08	0.02	0.01	0.08	0.02
0.18	0.02	0.16	0.04	0.01	0.08	0.02
0.19	0.04	0.24	0.06	0.01	0.08	0.02
0.20	0.05	0.33	0.07	0.01	0.09	0.02
0.21	0.06	0.42	0.09	0.01	0.09	0.02
0.23	0.08	0.52	0.11	0.01	0.10	0.02
0.24	0.10	0.62	0.13	0.02	0.10	0.02
0.26	0.11	0.73	0.15	0.02	0.11	0.02
0.28	0.13	0.84	0.17	0.02	0.12	0.02
0.30	0.15	0.97	0.19	0.02	0.13	0.02
0.31	0.17	1.11	0.21	0.02	0.14	0.02
0.34	0.20	1.26	0.24	0.02	0.15	0.02
0.36	0.22	1.42	0.26	0.03	0.17	0.02
0.38	0.25	1.61	0.29	0.03	0.18	0.03
0.41	0.29	1.80	0.31	0.03	0.20	0.03
0.44	0.32	2.02	0.34	0.04	0.22	0.03
0.46	0.36	2.26	0.37	0.04	0.23	0.03
0.50	0.41	2.51	0.40	0.04	0.25	0.03
0.53	0.45	2.78	0.43	0.05	0.27	0.03
0.56	0.51	3.08	0.47	0.05	0.30	0.03
0.60	0.56	3.40	0.50	0.06	0.32	0.03
0.64	0.62	3.74	0.54	0.06	0.34	0.03
0.69	0.68	4.10	0.57	0.06	0.36	0.04
0.73	0.75	4.48	0.61	0.07	0.38	0.04
0.78	0.82	4.88	0.64	0.07	0.40	0.04
0.83	0.89	5.29	0.68	0.07	0.42	0.04
0.89	0.96	5.73	0.72	0.07	0.43	0.04
0.95	1.03	6.17	0.76	0.07	0.45	0.04
1.01	1.11	6.64	0.80	0.08	0.47	0.04
1.08	1.19	7.13	0.84	0.08	0.49	0.04
1.15	1.27	7.64	0.89	0.08	0.51	0.05
1.23	1.35	8.18	0.94	0.08	0.53	0.05
1.31	1.44	8.74	0.99	0.09	0.56	0.05
1.40	1.53	9.33	1.04	0.09	0.59	0.06
1.49	1.62	9.95	1.10	0.09	0.62	0.06
1.59	1.72	10.60	1.17	0.10	0.64	0.06
1.70	1.82	11.27	1.23	0.10	0.67	0.07
1.81	1.92	11.96	1.30	0.11	0.69	0.07
1.93	2.04	12.68	1.38	0.11	0.72	0.07
2.06	2.15	13.42	1.46	0.12	0.74	0.08
2.20	2.28	14.19	1.54	0.12	0.77	0.08

Particle size (µm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
2.35	2.41	14.98	1.62	0.13	0.79	0.09
2.50	2.54	15.79	1.71	0.14	0.81	0.09
2.67	2.68	16.63	1.81	0.14	0.84	0.09
2.85	2.83	17.49	1.91	0.15	0.86	0.10
3.04	2.99	18.37	2.01	0.16	0.88	0.10
3.24	3.16	19.27	2.12	0.17	0.90	0.11
3.46	3.34	20.20	2.24	0.18	0.93	0.12
3.69	3.52	21.14	2.36	0.19	0.95	0.12
3.94	3.72	22.11	2.49	0.20	0.97	0.13
4.20	3.93	23.10	2.63	0.21	0.99	0.14
4.48	4.15	24.11	2.78	0.22	1.01	0.15
4.78	4.39	25.13	2.95	0.24	1.03	0.16
5.10	4.64	26.18	3.12	0.25	1.05	0.17
5.44	4.92	27.26	3.31	0.27	1.08	0.19
5.81	5.22	28.37	3.52	0.30	1.11	0.21
6.20	5.55	29.53	3.75	0.33	1.16	0.23
6.61	5.92	30.74	4.00	0.37	1.21	0.25
7.05	6.33	32.02	4.29	0.42	1.27	0.29
7.53	6.80	33.36	4.61	0.47	1.35	0.32
8.03	7.34	34.79	4.97	0.54	1.43	0.37
8.57	7.95	36.31	5.39	0.61	1.52	0.41
9.14	8.65	37.94	5.86	0.70	1.63	0.47
9.75	9.46	39.70	6.41	0.81	1.76	0.54
10.41	10.40	41.62	7.03	0.94	1.92	0.63
11.10	11.49	43.71	7.76	1.10	2.09	0.73
11.84	12.77	45.99	8.61	1.28	2.28	0.85
12.64	14.26	48.46	9.59	1.49	2.46	0.98
13.48	15.96	51.08	10.72	1.71	2.62	1.13
14.39	17.89	53.83	12.02	1.93	2.75	1.29
15.35	20.04	56.67	13.48	2.15	2.84	1.46
16.37	22.38	59.56	15.10	2.34	2.89	1.63
17.47	24.89	62.46	16.89	2.51	2.90	1.79
18.64	27.53	65.31	18.81	2.63	2.85	1.92
19.89	30.23	68.07	20.84	2.70	2.76	2.03
21.22	32.95	70.69	22.95	2.72	2.62	2.11
22.64	35.65	73.14	25.09	2.69	2.45	2.14
24.15	38.28	75.41	27.21	2.63	2.27	2.12
25.77	40.84	77.50	29.29	2.56	2.09	2.08
27.49	43.40	79.48	31.37	2.56	1.97	2.08
29.33	46.01	81.38	33.48	2.61	1.91	2.11
31.29	48.69	83.19	35.56	2.68	1.81	2.08
33.39	51.43	84.88	37.50	2.73	1.69	1.94

Particle size (µm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
35.62	54.20	86.44	39.26	2.77	1.55	1.76
38.01	57.05	87.87	40.94	2.85	1.44	1.68
40.55	60.02	89.22	42.71	2.97	1.35	1.77
43.26	63.14	90.50	44.68	3.13	1.28	1.97
46.16	66.41	91.69	46.84	3.27	1.20	2.16
49.25	69.81	92.80	49.08	3.40	1.11	2.24
52.54	73.33	93.82	51.30	3.52	1.01	2.22
56.06	76.94	94.73	53.47	3.61	0.92	2.18
59.81	80.62	95.56	55.65	3.68	0.83	2.17
63.81	84.29	96.29	57.85	3.67	0.73	2.21
68.08	87.83	96.93	60.10	3.54	0.64	2.24
72.64	91.11	97.47	62.38	3.28	0.54	2.29
77.50	93.94	97.93	64.70	2.83	0.46	2.32
82.68	96.21	98.30	67.02	2.27	0.37	2.32
88.22	97.88	98.59	69.32	1.67	0.29	2.30
94.12	98.96	98.82	71.58	1.08	0.22	2.26
100.42	99.56	98.98	73.77	0.60	0.17	2.20
107.14	99.84	99.10	75.86	0.28	0.12	2.09
114.30	99.95	99.19	77.78	0.11	0.09	1.91
121.95	99.99	99.25	79.54	0.04	0.06	1.76
130.11	100.00	99.30	81.17	0.01	0.05	1.63
138.82	100.00	99.34	82.66	0.00	0.04	1.48
148.11	100.00	99.36	84.00	0.00	0.03	1.35
158.02	100.00	99.39	85.25	0.00	0.02	1.25
168.59	100.00	99.41	86.46	0.00	0.02	1.21
179.87	100.00	99.43	87.69	0.00	0.02	1.23
191.91	100.00	99.45	88.99	0.00	0.02	1.30
204.75	100.00	99.47	90.42	0.00	0.02	1.43
218.45	100.00	99.49	92.03	0.00	0.02	1.61
233.07	100.00	99.51	93.83	0.00	0.02	1.80
248.67	100.00	99.53	95.62	0.00	0.02	1.78
265.31	100.00	99.56	97.06	0.00	0.02	1.45
283.06	100.00	99.58	98.04	0.00	0.03	0.98
302.00	100.00	99.61	98.65	0.00	0.03	0.61
322.21	100.00	99.65	99.05	0.00	0.04	0.40
343.77	100.00	99.71	99.32	0.00	0.06	0.27
366.77	100.00	99.78	99.49	0.00	0.07	0.18
391.32	100.00	99.86	99.62	0.00	0.07	0.13
417.50	100.00	99.92	99.73	0.00	0.07	0.11
445.44	100.00	99.97	99.85	0.00	0.05	0.12
475.24	100.00	100.00	100.00	0.00	0.03	0.15

Table 5c Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 25 g/L

Particle size (μm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD	CFD	FD	CFD
0.16	0.02	0.03	0.01	0.02	0.03	0.01
0.18	0.03	0.06	0.03	0.02	0.03	0.01
0.19	0.05	0.09	0.04	0.02	0.03	0.01
0.20	0.07	0.12	0.05	0.02	0.03	0.01
0.21	0.09	0.16	0.07	0.02	0.04	0.01
0.23	0.10	0.20	0.08	0.02	0.04	0.02
0.24	0.12	0.24	0.10	0.02	0.04	0.02
0.26	0.14	0.29	0.12	0.02	0.05	0.02
0.28	0.16	0.35	0.14	0.02	0.06	0.02
0.30	0.19	0.42	0.16	0.02	0.07	0.02
0.31	0.21	0.51	0.18	0.02	0.08	0.02
0.34	0.23	0.60	0.21	0.03	0.10	0.02
0.36	0.26	0.72	0.23	0.03	0.11	0.03
0.38	0.29	0.85	0.26	0.03	0.13	0.03
0.41	0.32	1.01	0.29	0.03	0.16	0.03
0.44	0.36	1.19	0.33	0.04	0.18	0.03
0.46	0.40	1.39	0.37	0.04	0.20	0.04
0.50	0.44	1.62	0.41	0.04	0.23	0.04
0.53	0.48	1.88	0.45	0.04	0.26	0.04
0.56	0.53	2.17	0.49	0.05	0.29	0.04
0.60	0.58	2.49	0.54	0.05	0.32	0.05
0.64	0.63	2.83	0.59	0.05	0.35	0.05
0.69	0.69	3.21	0.63	0.05	0.37	0.05
0.73	0.74	3.60	0.68	0.05	0.40	0.05
0.78	0.80	4.02	0.74	0.06	0.42	0.05
0.83	0.85	4.46	0.79	0.06	0.44	0.05
0.89	0.91	4.92	0.84	0.06	0.46	0.05
0.95	0.97	5.41	0.89	0.06	0.49	0.05
1.01	1.03	5.94	0.95	0.06	0.52	0.05
1.08	1.09	6.49	1.00	0.06	0.56	0.06
1.15	1.16	7.08	1.06	0.07	0.59	0.06
1.23	1.23	7.69	1.12	0.07	0.62	0.06
1.31	1.30	8.34	1.18	0.07	0.65	0.06
1.40	1.37	9.02	1.25	0.08	0.68	0.07
1.49	1.45	9.72	1.32	0.08	0.70	0.07
1.59	1.54	10.45	1.39	0.08	0.73	0.07
1.70	1.63	11.20	1.47	0.09	0.75	0.08
1.81	1.72	11.97	1.55	0.09	0.77	0.08
1.93	1.82	12.77	1.63	0.10	0.80	0.08
2.06	1.92	13.59	1.72	0.10	0.82	0.09

Particle size (µm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
2.35	2.14	15.29	1.91	0.11	0.86	0.10
2.50	2.26	16.18	2.01	0.12	0.89	0.10
2.67	2.39	17.10	2.11	0.13	0.92	0.10
2.85	2.52	18.04	2.22	0.13	0.94	0.11
3.04	2.66	19.01	2.33	0.14	0.97	0.11
3.24	2.81	20.00	2.45	0.15	0.99	0.12
3.46	2.97	21.02	2.58	0.16	1.02	0.13
3.69	3.14	22.06	2.71	0.17	1.04	0.13
3.94	3.32	23.12	2.85	0.18	1.06	0.14
4.20	3.51	24.21	3.00	0.19	1.09	0.15
4.48	3.72	25.32	3.16	0.21	1.11	0.16
4.78	3.94	26.45	3.34	0.22	1.14	0.17
5.10	4.18	27.62	3.52	0.24	1.17	0.19
5.44	4.43	28.82	3.72	0.26	1.20	0.20
5.81	4.72	30.07	3.95	0.28	1.25	0.22
6.20	5.03	31.36	4.19	0.31	1.30	0.24
6.61	5.38	32.72	4.46	0.35	1.35	0.27
7.05	5.77	34.14	4.76	0.39	1.42	0.30
7.53	6.21	35.63	5.10	0.44	1.49	0.34
8.03	6.71	37.20	5.48	0.50	1.57	0.38
8.57	7.27	38.85	5.90	0.57	1.66	0.43
9.14	7.92	40.62	6.39	0.64	1.76	0.48
9.75	8.65	42.50	6.94	0.74	1.88	0.55
10.41	9.51	44.53	7.57	0.85	2.02	0.63
11.10	10.49	46.70	8.30	0.99	2.17	0.73
11.84	11.63	49.02	9.15	1.14	2.32	0.85
12.64	12.95	51.49	10.13	1.32	2.47	0.98
13.48	14.45	54.09	11.26	1.50	2.60	1.12
14.39	16.13	56.78	12.53	1.68	2.69	1.28
15.35	17.99	59.51	13.97	1.86	2.73	1.43
16.37	20.02	62.25	15.56	2.02	2.73	1.59
17.47	22.17	64.93	17.29	2.16	2.68	1.73
18.64	24.43	67.51	19.14	2.25	2.58	1.85
19.89	26.74	69.94	21.09	2.31	2.43	1.95
21.22	29.06	72.19	23.11	2.32	2.25	2.02
22.64	31.35	74.23	25.15	2.29	2.05	2.05
24.15	33.59	76.07	27.19	2.24	1.84	2.04
25.77	35.77	77.73	29.21	2.18	1.66	2.01
27.49	37.95	79.26	31.23	2.18	1.53	2.02
29.33	40.18	80.72	33.30	2.22	1.46	2.07
31.29	42.45	82.11	35.34	2.27	1.39	2.04

Particle size (μm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
35.62	47.01	84.68	38.94	2.28	1.25	1.71
38.01	49.29	85.88	40.58	2.28	1.21	1.64
40.55	51.59	87.07	42.31	2.30	1.19	1.73
43.26	53.93	88.25	44.26	2.34	1.18	1.95
46.16	56.29	89.41	46.41	2.36	1.16	2.16
49.25	58.66	90.53	48.68	2.37	1.12	2.27
52.54	61.05	91.59	50.96	2.39	1.06	2.28
56.06	63.47	92.56	53.21	2.42	0.98	2.25
59.81	65.95	93.46	55.47	2.47	0.89	2.26
63.81	68.48	94.26	57.77	2.53	0.81	2.30
68.08	71.05	94.98	60.11	2.57	0.71	2.34
72.64	73.68	95.60	62.49	2.63	0.63	2.38
77.50	76.32	96.14	64.88	2.64	0.54	2.40
82.68	78.96	96.60	67.26	2.64	0.46	2.38
88.22	81.58	96.99	69.56	2.63	0.39	2.30
94.12	84.14	97.31	71.76	2.56	0.32	2.20
100.42	86.59	97.57	73.84	2.45	0.26	2.09
107.14	88.88	97.78	75.76	2.29	0.21	1.92
114.30	90.96	97.95	77.46	2.08	0.17	1.69
121.95	92.79	98.08	78.96	1.83	0.14	1.50
130.11	94.37	98.20	80.30	1.58	0.11	1.34
138.82	95.70	98.30	81.48	1.32	0.10	1.18
148.11	96.77	98.39	82.53	1.07	0.09	1.05
158.02	97.61	98.47	83.51	0.84	0.09	0.97
168.59	98.25	98.56	84.46	0.64	0.09	0.95
179.87	98.73	98.66	85.47	0.48	0.10	1.01
191.91	99.10	98.76	86.60	0.36	0.11	1.13
204.75	99.36	98.88	87.95	0.27	0.12	1.35
218.45	99.55	99.01	89.63	0.19	0.13	1.68
233.07	99.69	99.14	91.72	0.13	0.13	2.09
248.67	99.77	99.26	94.00	0.09	0.11	2.29
265.31	99.83	99.35	96.02	0.06	0.09	2.01
283.06	99.86	99.42	97.44	0.03	0.07	1.43
302.00	99.88	99.49	98.34	0.02	0.06	0.90
322.21	99.90	99.55	98.91	0.01	0.06	0.56
343.77	99.91	99.61	99.26	0.01	0.06	0.35
366.77	99.92	99.68	99.47	0.01	0.07	0.21
391.32	99.93	99.76	99.61	0.01	0.08	0.14
417.50	99.94	99.84	99.72	0.01	0.08	0.12
445.44	99.97	99.92	99.85	0.02	0.08	0.13
475.24	100.00	100.00	100.00	0.03	0.08	0.15

Table 5d Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 30 g/L

Particle size (μm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD	CFD	FD	CFD
0.16	0.01	0.04	0.01	0.01	0.04	0.01
0.18	0.02	0.08	0.01	0.01	0.04	0.01
0.19	0.03	0.13	0.02	0.01	0.04	0.01
0.20	0.04	0.17	0.03	0.01	0.05	0.01
0.21	0.05	0.23	0.04	0.01	0.05	0.01
0.23	0.06	0.28	0.05	0.01	0.06	0.01
0.24	0.07	0.34	0.06	0.01	0.06	0.01
0.26	0.08	0.41	0.07	0.01	0.07	0.01
0.28	0.10	0.49	0.08	0.01	0.08	0.01
0.30	0.12	0.58	0.09	0.02	0.09	0.01
0.31	0.13	0.69	0.11	0.02	0.10	0.02
0.34	0.15	0.81	0.13	0.02	0.12	0.02
0.36	0.18	0.94	0.15	0.02	0.14	0.02
0.38	0.20	1.10	0.17	0.03	0.16	0.02
0.41	0.23	1.28	0.20	0.03	0.18	0.03
0.44	0.27	1.48	0.23	0.03	0.20	0.03
0.46	0.31	1.71	0.26	0.04	0.23	0.03
0.50	0.35	1.96	0.30	0.04	0.25	0.04
0.53	0.39	2.24	0.34	0.05	0.28	0.04
0.56	0.44	2.55	0.38	0.05	0.31	0.04
0.60	0.50	2.89	0.43	0.06	0.34	0.05
0.64	0.56	3.25	0.48	0.06	0.37	0.05
0.69	0.62	3.64	0.54	0.06	0.39	0.05
0.73	0.69	4.06	0.59	0.07	0.41	0.06
0.78	0.75	4.49	0.65	0.07	0.43	0.06
0.83	0.82	4.94	0.71	0.07	0.45	0.06
0.89	0.89	5.41	0.77	0.07	0.47	0.06
0.95	0.97	5.90	0.83	0.07	0.49	0.06
1.01	1.04	6.42	0.89	0.07	0.52	0.06
1.08	1.12	6.96	0.95	0.08	0.54	0.06
1.15	1.20	7.52	1.01	0.08	0.57	0.06
1.23	1.28	8.12	1.07	0.08	0.59	0.06
1.31	1.36	8.74	1.14	0.09	0.62	0.07
1.40	1.45	9.39	1.21	0.09	0.65	0.07
1.49	1.55	10.06	1.28	0.09	0.67	0.07
1.59	1.64	10.76	1.36	0.10	0.70	0.07
1.70	1.74	11.48	1.43	0.10	0.72	0.08
1.81	1.85	12.23	1.51	0.10	0.75	0.08
1.93	1.96	13.00	1.59	0.11	0.77	0.08
2.06	2.07	13.79	1.68	0.11	0.79	0.09
2.20	2.19	14.60	1.77	0.12	0.81	0.09

Particle size (μm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
2.35	2.31	15.44	1.86	0.12	0.84	0.09
2.50	2.44	16.30	1.96	0.13	0.86	0.10
2.67	2.57	17.20	2.07	0.13	0.89	0.10
2.85	2.71	18.12	2.18	0.14	0.92	0.11
3.04	2.85	19.07	2.29	0.15	0.95	0.12
3.24	3.01	20.05	2.41	0.15	0.98	0.12
3.46	3.17	21.05	2.54	0.16	1.01	0.13
3.69	3.34	22.09	2.68	0.17	1.03	0.14
3.94	3.52	23.15	2.82	0.18	1.06	0.14
4.20	3.72	24.24	2.98	0.20	1.09	0.15
4.48	3.93	25.36	3.14	0.21	1.12	0.16
4.78	4.16	26.51	3.32	0.23	1.15	0.18
5.10	4.41	27.69	3.51	0.25	1.19	0.19
5.44	4.68	28.92	3.71	0.27	1.23	0.20
5.81	4.97	30.20	3.93	0.29	1.28	0.22
6.20	5.29	31.54	4.18	0.32	1.34	0.25
6.61	5.65	32.94	4.45	0.36	1.40	0.27
7.05	6.05	34.42	4.75	0.40	1.48	0.30
7.53	6.49	35.97	5.09	0.45	1.56	0.34
8.03	7.00	37.61	5.48	0.50	1.64	0.38
8.57	7.57	39.34	5.91	0.57	1.73	0.43
9.14	8.22	41.17	6.39	0.65	1.83	0.49
9.75	8.97	43.12	6.95	0.75	1.94	0.56
10.41	9.83	45.19	7.59	0.86	2.08	0.64
11.10	10.83	47.40	8.33	1.00	2.21	0.74
11.84	12.00	49.76	9.19	1.17	2.36	0.86
12.64	13.35	52.25	10.18	1.35	2.49	1.00
13.48	14.89	54.86	11.33	1.54	2.60	1.15
14.39	16.64	57.53	12.64	1.74	2.68	1.30
15.35	18.58	60.24	14.10	1.94	2.71	1.47
16.37	20.69	62.94	15.72	2.12	2.70	1.62
17.47	22.97	65.58	17.49	2.27	2.64	1.77
18.64	25.35	68.11	19.38	2.39	2.54	1.89
19.89	27.81	70.51	21.37	2.46	2.40	1.99
21.22	30.29	72.74	23.42	2.48	2.23	2.05
22.64	32.76	74.79	25.49	2.47	2.05	2.07
24.15	35.17	76.66	27.54	2.41	1.87	2.05
25.77	37.53	78.37	29.56	2.36	1.71	2.02
27.49	39.88	79.97	31.57	2.35	1.60	2.01
29.33	42.28	81.52	33.62	2.40	1.54	2.04
31.29	44.71	83.00	35.62	2.43	1.49	2.00
33.39	47.15	84.41	37.46	2.44	1.41	1.84

Particle size (µm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
35.62	49.56	85.75	39.12	2.41	1.33	1.66
38.01	51.99	87.01	40.73	2.42	1.26	1.60
40.55	54.47	88.23	42.45	2.48	1.22	1.72
43.26	57.05	89.41	44.43	2.58	1.18	1.98
46.16	59.70	90.53	46.68	2.66	1.13	2.24
49.25	62.43	91.60	49.06	2.72	1.06	2.38
52.54	65.20	92.59	51.45	2.77	0.99	2.39
56.06	68.04	93.51	53.79	2.83	0.91	2.34
59.81	70.96	94.34	56.11	2.92	0.84	2.32
63.81	73.97	95.10	58.44	3.01	0.76	2.33
68.08	77.06	95.78	60.76	3.09	0.68	2.32
72.64	80.22	96.37	63.04	3.16	0.60	2.29
77.50	83.40	96.89	65.26	3.18	0.52	2.22
82.68	86.51	97.33	67.37	3.12	0.44	2.10
88.22	89.48	97.71	69.30	2.97	0.38	1.93
94.12	92.20	98.03	71.03	2.72	0.32	1.73
100.42	94.55	98.30	72.53	2.35	0.26	1.50
107.14	96.46	98.51	73.79	1.91	0.21	1.26
114.30	97.88	98.68	74.80	1.42	0.17	1.01
121.95	98.84	98.82	75.62	0.97	0.13	0.82
130.11	99.44	98.92	76.29	0.59	0.11	0.68
138.82	99.76	99.01	76.85	0.32	0.08	0.56
148.11	99.91	99.07	77.33	0.15	0.07	0.48
158.02	99.97	99.12	77.77	0.06	0.05	0.44
168.59	99.99	99.17	78.23	0.02	0.04	0.45
179.87	100.00	99.20	78.76	0.01	0.04	0.53
191.91	100.00	99.24	79.46	0.00	0.03	0.70
204.75	100.00	99.27	80.53	0.00	0.03	1.06
218.45	100.00	99.30	82.26	0.00	0.03	1.73
233.07	100.00	99.33	85.10	0.00	0.03	2.84
248.67	100.00	99.35	89.05	0.00	0.03	3.95
265.31	100.00	99.38	93.16	0.00	0.03	4.11
283.06	100.00	99.41	96.26	0.00	0.03	3.09
302.00	100.00	99.45	98.07	0.00	0.04	1.81
322.21	100.00	99.50	99.00	0.00	0.05	0.93
343.77	100.00	99.57	99.43	0.00	0.07	0.43
366.77	100.00	99.67	99.62	0.00	0.10	0.19
391.32	100.00	99.78	99.72	0.00	0.11	0.10
417.50	100.00	99.88	99.80	0.00	0.10	0.08
445.44	100.00	99.95	99.89	0.00	0.07	0.09
475.24	100.00	100.00	100.00	0.00	0.05	0.11

Table 5e Volume frequency (FD) and cumulative (CFD) particle size distribution of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton oxidized sludge (FS) at TS of 40 g/L

Particle size (µm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD	CFD	FD	CFD
0.16	0.00	0.03	0.01	0.00	0.03	0.01
0.18	0.01	0.07	0.02	0.00	0.03	0.01
0.19	0.01	0.10	0.03	0.00	0.04	0.01
0.20	0.02	0.14	0.04	0.01	0.04	0.01
0.21	0.03	0.18	0.05	0.01	0.04	0.01
0.23	0.03	0.23	0.06	0.01	0.04	0.01
0.24	0.04	0.28	0.07	0.01	0.05	0.01
0.26	0.05	0.33	0.08	0.01	0.05	0.01
0.28	0.05	0.40	0.10	0.01	0.06	0.02
0.30	0.06	0.47	0.12	0.01	0.07	0.02
0.31	0.07	0.55	0.14	0.01	0.08	0.02
0.34	0.09	0.64	0.16	0.01	0.09	0.02
0.36	0.10	0.74	0.18	0.02	0.10	0.03
0.38	0.12	0.86	0.21	0.02	0.12	0.03
0.41	0.14	0.99	0.24	0.02	0.13	0.03
0.44	0.17	1.15	0.28	0.02	0.15	0.03
0.46	0.19	1.31	0.31	0.03	0.17	0.04
0.50	0.23	1.50	0.35	0.03	0.19	0.04
0.53	0.26	1.71	0.40	0.04	0.21	0.04
0.56	0.31	1.94	0.44	0.04	0.23	0.05
0.60	0.35	2.19	0.49	0.05	0.25	0.05
0.64	0.40	2.46	0.55	0.05	0.27	0.05
0.69	0.46	2.75	0.60	0.06	0.29	0.06
0.73	0.52	3.06	0.66	0.06	0.31	0.06
0.78	0.58	3.38	0.72	0.06	0.32	0.06
0.83	0.64	3.71	0.78	0.06	0.33	0.06
0.89	0.71	4.06	0.84	0.07	0.35	0.06
0.95	0.78	4.43	0.90	0.07	0.37	0.06
1.01	0.85	4.81	0.96	0.07	0.38	0.06
1.08	0.93	5.21	1.03	0.08	0.40	0.06
1.15	1.01	5.63	1.09	0.08	0.42	0.07
1.23	1.09	6.07	1.16	0.08	0.44	0.07
1.31	1.17	6.53	1.23	0.08	0.46	0.07
1.40	1.26	7.01	1.30	0.09	0.48	0.07
1.49	1.35	7.51	1.38	0.09	0.50	0.07
1.59	1.44	8.02	1.45	0.09	0.51	0.08
1.70	1.53	8.55	1.54	0.09	0.53	0.08
1.81	1.63	9.10	1.62	0.10	0.55	0.08
1.93	1.73	9.66	1.71	0.10	0.56	0.09
2.06	1.84	10.25	1.80	0.10	0.58	0.09
2.20	1.95	10.85	1.90	0.11	0.60	0.10

Particle size (µm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
2.35	2.06	11.47	2.00	0.11	0.62	0.10
2.50	2.18	12.12	2.11	0.12	0.65	0.11
2.67	2.30	12.79	2.23	0.12	0.67	0.11
2.85	2.43	13.49	2.35	0.13	0.70	0.12
3.04	2.57	14.21	2.47	0.14	0.72	0.13
3.24	2.72	14.95	2.61	0.15	0.74	0.13
3.46	2.87	15.72	2.75	0.15	0.77	0.14
3.69	3.03	16.52	2.89	0.16	0.80	0.15
3.94	3.21	17.34	3.05	0.17	0.82	0.16
4.20	3.40	18.19	3.21	0.19	0.85	0.16
4.48	3.59	19.08	3.39	0.20	0.89	0.17
4.78	3.81	20.00	3.57	0.21	0.92	0.18
5.10	4.04	20.97	3.77	0.23	0.97	0.20
5.44	4.29	21.99	3.98	0.25	1.02	0.21
5.81	4.57	23.08	4.21	0.28	1.09	0.23
6.20	4.87	24.24	4.47	0.30	1.16	0.25
6.61	5.21	25.49	4.75	0.34	1.25	0.28
7.05	5.58	26.85	5.05	0.38	1.35	0.31
7.53	6.01	28.32	5.39	0.42	1.47	0.34
8.03	6.48	29.92	5.77	0.48	1.60	0.38
8.57	7.02	31.67	6.20	0.54	1.75	0.42
9.14	7.63	33.59	6.67	0.61	1.92	0.47
9.75	8.33	35.70	7.21	0.70	2.11	0.54
10.41	9.13	38.04	7.82	0.81	2.34	0.62
11.10	10.07	40.62	8.53	0.94	2.58	0.71
11.84	11.15	43.46	9.35	1.09	2.84	0.82
12.64	12.41	46.56	10.29	1.26	3.10	0.94
13.48	13.84	49.88	11.37	1.44	3.32	1.08
14.39	15.47	53.38	12.60	1.62	3.50	1.22
15.35	17.27	56.99	13.96	1.80	3.61	1.37
16.37	19.24	60.64	15.48	1.97	3.65	1.51
17.47	21.36	64.24	17.12	2.11	3.60	1.64
18.64	23.58	67.69	18.88	2.22	3.46	1.76
19.89	25.87	70.93	20.72	2.29	3.24	1.84
21.22	28.18	73.88	22.62	2.31	2.95	1.91
22.64	30.48	76.52	24.56	2.30	2.64	1.93
24.15	32.73	78.84	26.49	2.25	2.32	1.93
25.77	34.92	80.86	28.39	2.20	2.03	1.90
27.49	37.12	82.68	30.29	2.19	1.82	1.91
29.33	39.35	84.36	32.24	2.24	1.68	1.95
31.29	41.63	85.90	34.16	2.27	1.54	1.92
33.39	43.90	87.32	35.95	2.27	1.42	1.78

Particle size (μm)	RS		UIS		FS	
	FD	CFD	FD		FD	CFD
35.62	46.14	88.62	37.56	2.24	1.30	1.62
38.01	48.38	89.83	39.12	2.24	1.21	1.56
40.55	50.66	90.97	40.80	2.28	1.14	1.68
43.26	53.01	92.06	42.73	2.35	1.09	1.93
46.16	55.40	93.09	44.91	2.39	1.02	2.18
49.25	57.82	94.04	47.22	2.42	0.95	2.32
52.54	60.25	94.90	49.56	2.43	0.87	2.33
56.06	62.69	95.68	51.85	2.44	0.77	2.29
59.81	65.16	96.36	54.13	2.47	0.68	2.28
63.81	67.68	96.96	56.42	2.52	0.60	2.29
68.08	70.25	97.47	58.69	2.57	0.51	2.27
72.64	72.87	97.91	60.91	2.62	0.44	2.22
77.50	75.54	98.28	63.03	2.66	0.37	2.12
82.68	78.22	98.58	65.00	2.68	0.30	1.97
88.22	80.89	98.82	66.75	2.67	0.25	1.75
94.12	83.51	99.02	68.27	2.62	0.20	1.52
100.42	86.04	99.18	69.55	2.53	0.15	1.28
107.14	88.43	99.29	70.57	2.39	0.11	1.03
114.30	90.61	99.37	71.37	2.18	0.08	0.79
121.95	92.55	99.44	71.98	1.94	0.06	0.62
130.11	94.22	99.48	72.47	1.67	0.05	0.49
138.82	95.61	99.52	72.85	1.39	0.04	0.39
148.11	96.73	99.55	73.17	1.12	0.03	0.32
158.02	97.59	99.57	73.46	0.87	0.02	0.29
168.59	98.24	99.59	73.77	0.65	0.02	0.30
179.87	98.73	99.60	74.14	0.48	0.02	0.37
191.91	99.08	99.62	74.67	0.36	0.02	0.53
204.75	99.34	99.64	75.56	0.26	0.02	0.89
218.45	99.53	99.65	77.22	0.19	0.02	1.66
233.07	99.66	99.67	80.34	0.13	0.02	3.12
248.67	99.75	99.69	85.27	0.09	0.02	4.93
265.31	99.80	99.71	90.89	0.06	0.02	5.62
283.06	99.84	99.73	95.30	0.03	0.02	4.40
302.00	99.86	99.75	97.83	0.02	0.02	2.53
322.21	99.87	99.78	99.02	0.02	0.03	1.19
343.77	99.89	99.81	99.51	0.01	0.03	0.49
366.77	99.90	99.84	99.69	0.01	0.04	0.19
391.32	99.92	99.88	99.77	0.01	0.04	0.08
417.50	99.93	99.93	99.83	0.02	0.04	0.06
445.44	99.96	99.97	99.90	0.03	0.04	0.07
475.24	100.00	100.00	100.00	0.04	0.03	0.10

Table 6 CST measurement of raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS) and Fenton sludge (FS) at TS 10–40 g/L

TS, g/L	CST (s)		
	RS	UIS	FS
10	203	218.8	77.8
20	403.4	398.6	163.9
25	457	462.7	213
30	565.6	505	279.7
40	615.7	703.3	384.3

Table 7 Effect of pre-treatment on solubilization and biodegradability of sludge

TS (g/L)	Solubilization (%)			Biodegradability (%)		
	RS	UIS	FS	RS	UIS	FS
10	74.3	83.3	78.015	58.8	59.0352	68.8
20	64.2	79.2	67.41	63.3	73.3647	71.2
25	59.7	74.5	64.476	64.61	77.0151	72.9
30	53.5	70	55.105	62.39	70.4383	67
40	50.4	64.7	51.408	62.2	66.6162	66.6

ANNEXE III
EFFECT OF ULTRASONIFICATION AND FENTON OXIDATION ON
BIODEGRADATION OF BIS(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE (DEHP)
IN WASTEWATER SLUDGE

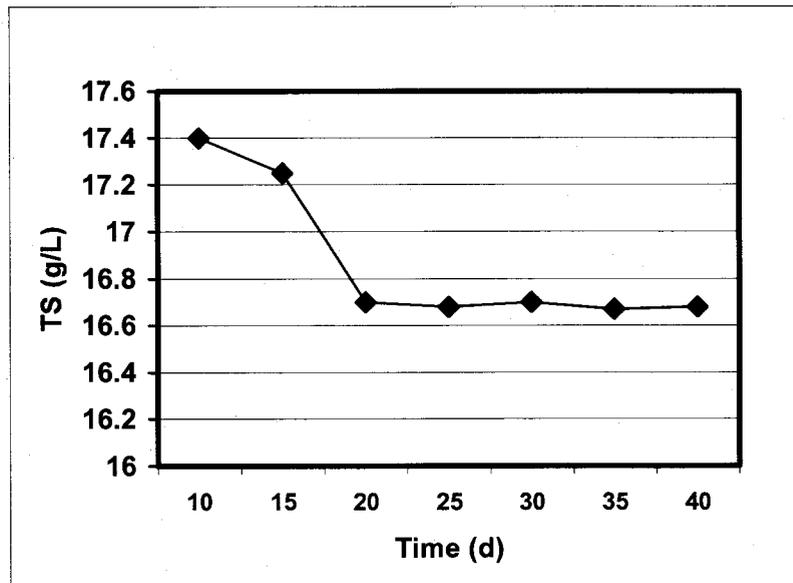
Table 8 Removal of DEHP and 2-ethylhexanoic acid calculated as mass during aerobic digestion (20 days of incubation time) in raw sludge (RS), ultrasonicated sludge (UIS), and Fenton oxidized sludge (FS)

		DEHP			2-ethylhexanoic acid		
		RS	UIS	FS	RS	UIS	FS
0 – day digestion	Concentration (mg/kg)	31.4	37.8	26.22	28.8	39.3	25.1
	Mass (mg)	58.88	70.87	49.16	54.0	73.69	47.06
20-days digestion	Concentration (mg/kg)	24.6	18.4	14.10	23.6	27.9	19.3
	Mass (mg)	16.60	7.91	7.19	15.93	11.99	9.84
Removal in mass (%)		0.72	0.89	0.85	0.70	0.84	0.80

ANNEXE IV

DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES DU TEST DE BIODÉGRADABILITÉ

Données de la réduction des solides totaux observée pendant 40 jours de la biodégradation aérobie. Solides totaux des boues : 25 g/L; 2 % d'inoculum des boues fraîches, à 25 ° C, 150 rpm d'agitation.



ANNEXE V
DONNÉES DES TRAVAUX D'OPTIMISATION

Données supplémentaires de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle mathématique pour l'ultrasonication des boues d'épuration vis-à-vis la biodégradabilité. Effet des variables indépendantes : X_1 = Intensité ultrasonique; X_2 = Temps d'exposition; X_3 = Solides totaux.

Effet	Solubilization					Biodegradability				
	SE	dl	ME	F	<i>p</i>	SE	dl	ME	F	<i>p</i>
X_1 (L)	0.0004	1	0.0004	34.1	0.002	0.0045	1	0.0045	5.4	0.07
X_1 (Q)	0.0044	1	0.0044	398.1	0.000006	0.04	1	0.04	47.7	0.001
X_2 (L)	0.00045	1	0.0004 5	41.3	0.001	0.004	1	0.004	4.3	0.1
X_2 (Q)	0.0023	1	0.0023	205.7	0.00003	0.023	1	0.023	27.2	0.003
X_3 (L)	0.2132	1	0.2132	19189. 9	0.000000	0.0004	1	0.0004	0.4	0.53
X_3 (Q)	0.00004	1	0.0000 4	3.4	0.12	0.013	1	0.013	15.7	0.0107
$X_1 - X_2$	0.00001	1	0.0000 1	0.97	0.37	0.0002	1	0.0002	0.3	0.62
$X_1 - X_3$	0.0008	1	0.0008	70.5	0.0004	0.002	1	0.002	2.0	0.22
$X_2 - X_3$	0.0005	1	0.0005	42.1	0.0013	0.003	1	0.003	3.1	0.14
Manque d'ajustement	0.0559	5	0.0112	1006.8	0.000000	0.007	5	0.001	1.7	0.28
Erreur pure	0.00006	5	0.0000 1			0.004	5	0.0008		
Total	0.2777	19				0.092	19			
R^2	0.79					0.87				

Données supplémentaires de l'analyse de la variance (ANOVA) du modèle mathématique pour l'oxydation des boues d'épuration vis-à-vis la biodégradabilité. Effet des variables indépendantes : $X_1 = [H_2O_2]_0/[Fe^{2+}]_0$; $X_2 =$ Temps de réaction; $X_3 =$ Solides totaux.

Composante	Estimation d'effet				Coefficient de régression			
	Augmentation de SCOD		Biodégradabilité		Augmentation de SCOD		Biodégradabilité	
	Effet	<i>p</i>	Effet	<i>p</i>	Coefficient régression	<i>P</i>	Coefficient régression	<i>p</i>
Constant	0.47	0.0	0.613	0.0	-169.5	0.01	263.38	0.000001
X_1	-0.021	0.356	0.025	0.374	0.302	0.21	-0.56	0.0004
X_1^2	-0.069	0.008	0.078	0.014	-0.001	0.009	0.002	0.000003
X_2	-0.066	0.012	-0.09	0.0069	1.767	0.133	-1.7	0.008
X_2^2	-0.064	0.011	0.082	0.01	-0.032	0.0121	0.01	0.030901
X_3	0.062	0.016	0.016	0.553	5.609	0.002	-4.7	0.00003
X_3^2	-0.095	0.001	0.06	0.039	-0.047	0.001	0.038	0.00002
$X_1 * X_2$	-0.026	0.369	0.0188	0.6	-0.003	0.369	0.002	0.193
$X_1 * X_3$	0.026	0.384	-0.004	0.9	0.003	0.386	-0.0005	0.72
$X_2 * X_3$	-0.004	0.884	0.012	0.58	-0.002	0.89	0.01	0.17

ANNEXE VI

ÉQUATIONS SUPPLÉMENTAIRES

Taux spécifique de croissance maximal - μ

$$\mu = \frac{(\lg N - \lg N_0)}{(t - t_0)} \times 2.303$$

N : Nombre des cellules à la fin (t heures) de la phase exponentielle de la fermentation.

N_0 : Nombre des cellules au début (t_0 heures) de la phase exponentielle de la fermentation.

Sporulation % = Nombre des spores/Nombre des cellules totales

